

BIBLIOTECAS UNACH
FAC. MEDICINA HUMANA



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE CHIAPAS

FACULTAD DE MEDICINA HUMANA

CAMPUS II

COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

**PATOGENICIDAD DE DOS CEPAS AISLADAS EN MÉXICO DEL
VIRUS DEL OESTE DEL NILO, EN AVIFAUNA SILVESTRE:
Quiscalus mexicanus y *Passer domesticus*.**

QUE PRESENTA

MARÍA TERESA DE JESÚS TRUJILLO OLIVERA

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD



TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS, MÉXICO

2008

ESTE DOCUMENTO ES PRODUCTO DEL PROYECTO FOMIX CHIAPAS-
CONACYT-GOBIERNO DEL ESTADO (CLAVE CHIS030755)-MAESTRIA EN
SALUD AMBIENTAL Y ENFERMEDADES TRANSMISIBLES, DE LA CUAL LA
SUSTENTANTE ES EGRESADA.

LA FASE EXPERIMENTAL SE FINANCIÓ CON RECURSOS DEL PROYECTO
CHIS-2005-C03-075.

DEDICATORIA:

A mi familia, especialmente a mi hija Alejandra, por razones obvias.

AGRADECIMIENTOS:

Un especial agradecimiento a mi familia por los tiempos dedicados a los logros personales.

Agradecimientos sinceros a la Dra. Laura Elena Trujillo Olivera y al Estadístico Pedro Villafañe Villafañe por su tiempo y asesoría.

Agradecimientos sinceros al Dr. José Guillermo Estrada Franco, por compartir su experiencia, enseñanza y asesoría en la realización de este trabajo.

Agradecimientos a todo el personal del Instituto de Historia Natural, pero en especial al M.V.Z. Sergio Guerrero Sánchez por el apoyo recibido.

Agradecimientos al Dr. Nicholas Komar y Dra. Nicole Nemeth por los valiosos aportes.

Agradecimientos al Instituto de Historia Natural (Zoológico Miguel Álvarez del Toro), Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología (CENID-INIFAP), Center for Disease Control (CDC) de Fort Collins y Zoológico de Zacango por el apoyo recibido.

INDICE

| | |
|--|----|
| RESUMEN | 5 |
| I. INTRODUCCION | 8 |
| II. MARCO TEÓRICOS | 12 |
| Agente etiológico: Virus del Oeste del Nilo | 12 |
| Enfermedad del Virus del Oeste del Nilo. | 18 |
| Vectores..... | 24 |
| Hospederos Amplificadores..... | 27 |
| Especies aviares chiapanecas en estudio | 29 |
| Zanate común (<i>Quiscalus mexicanus</i>)..... | 30 |
| Gorrión Doméstico (<i>Passer domesticus</i>) | 33 |
| III. ALCANCES Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO..... | 37 |
| IV. MATERIAL Y MÉTODOS | 39 |
| Tipo de estudio..... | 39 |
| Sujetos experimentales | 39 |
| Colecta y traslado..... | 39 |
| Mantenimiento, alimentación y traslado..... | 40 |
| Cepas utilizadas | 41 |
| Fase experimental | 42 |
| Inoculación y observación | 42 |
| Colecta de muestras serológicas | 43 |
| Procesamiento de las muestras serológicas | 43 |
| Re-inoculación..... | 43 |
| Necropsias..... | 44 |
| Procesamiento de las muestras colectadas..... | 44 |
| Técnicas de Laboratorio..... | 44 |
| Análisis de resultados | 44 |
| V. RESULTADOS | 47 |
| Determinación de las viremias observadas en las especies estudiadas..... | 47 |
| Observación de signos y manifestaciones clínicas. | 50 |
| Mortalidad y morbilidad | 51 |
| Cepa Tabasco | 51 |
| Cepa Tecate..... | 51 |
| Grupo Gorriones. | 52 |
| Grupo Zanates..... | 53 |
| Hallazgos de necropsia | 54 |
| Tropismo viral..... | 54 |
| Presencia de Anticuerpos neutralizantes a la 2ª. Re inoculación en el Grupo de Zanates y gorriones | 55 |
| Descargas virales | 56 |
| Determinación estadística de la patogenicidad de las cepas según especie..... | 56 |
| Cepa Tecate..... | 56 |
| Cepa Tabasco | 57 |
| VI. DISCUSIÓN | 58 |

| | |
|---|----|
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 66 |
| Apéndice 1 | 72 |
| BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO NIVEL 3..... | 72 |
| PROTOCOLOS DE LABORATORIO..... | 73 |
| Anexo 1 | 77 |
| PERMISO PARA ENVIO Y TRANSPORTACION DE MUESTRAS Y BIOLÓGICOS AL CDC, FORT COLLINS..... | 77 |
| Anexo 2 | 78 |
| PERMISO PARA TRANSPORTACION DE AVES..... | 78 |
| Anexo 3 | 79 |
| REGISTRO DE TOMA DE MUESTRAS SEROLÓGICAS Y PESO DE LAS AVES... | 81 |

RESUMEN

La fiebre por el Virus del Oeste del Nilo (VON) está entre las enfermedades emergentes del fin del siglo XX, que ha creado alarma y representa una amenaza a la salud pública; particularmente del Continente Americano. El virus se mantiene en la naturaleza principalmente en ciclos de transmisión que involucran a mosquitos y aves. En concreto, en Estados Unidos se han reconocido como hospederos amplificadores principales del VON a distintas especies aviares silvestres. En México, la distribución del VON, así como los ciclos de circulación viral en los hospederos amplificadores aviares silvestres, es desconocida. El trabajo que se presenta pretende clarificar algunos aspectos sobre un supuesto papel en estos ciclos virales de dos especies aviares estratégicamente seleccionadas; un passerino (*Passer domesticus*) y un ictérico (*Quiscalus mexicanus*).

La especie *Quiscalus mexicanus*, conocida comúnmente como *zanate*, se eligió por ser abundante en México, particularmente en el estado de Chiapas, con una distribución importante en las regiones costa y valles centrales. Esta especie, perteneciente a la familia *Icteridae*, reforzaría las observaciones que se han hecho en EEUU, donde se demuestra que una especie muy cercana filogenética y morfológicamente, *Quiscalus quiscula*, es un excelente amplificador del virus. Esto presupondría un papel relevante de la familia *Icteridae*, en particular en el neotrópico Mexicano, en los ciclos del VON. Adicionalmente se seleccionó al *Passer domesticus* conocido como *gorrión chillón*, porque la especie es cosmopolita y aunque no es migratoria se ha demostrado que funciona como excelente hospedero amplificador del VON en estudios previos en diversas regiones geográficas de EEUU y específicamente con la cepa original NY99. Ambas especies se comparan experimentalmente con dos cepas autóctonas mexicanas hipotéticamente diferentes genotípica y fenotípicamente.

En esta investigación se determinó la patogenicidad y virulencia de los aislados mexicanos del VON; ambos de tejidos del *Corvus corax* (cuervo americano), uno del neoártico (Tecate, Baja California Norte, cepa BMC-04 Cc, código de acceso del Banco Internacional del Genoma DQ 080060) y otro del neotrópico (Tabasco, Villahermosa, cepa TM-17103, código de acceso del Banco Internacional del Genoma AY 660002). Se probó la hipótesis de que el comportamiento de las dos cepas en dos especies aviares de la fauna silvestre mexicana podrían tener un comportamiento diferencial. En el estudio se utilizaron 10 zanates mexicanos y 13 gorriones domésticos que fueron asignados a cuatro grupos de experimentación, con el control respectivo.

Ambas especies se inocularon con una dosis de 10^4 UFP (Unidades Formadoras de Placas) el día 14 post infección las dos especies fueron inoculadas con las cepas invertidas (los inoculados con Tecate se desafiaron nuevamente con Tabasco, para observar una posible protección cruzada inmune. Posteriormente se hizo un seguimiento cotidiano durante 28 días, observándose signos de infección en las aves inoculadas y colectándose muestras sanguíneas para

determinar al final del periodo de experimentación las viremias, mortalidad, titulación de anticuerpos neutralizantes y tropismo viral.

Las muestras de sangre y tejidos fueron procesadas para detección viral con las pruebas de Ensayo de Placas y Reducción y Neutralización de Placas (PRNT) para la determinación de anticuerpos al Virus del Oeste del Nilo.

Entre los resultados más importantes se encuentra que la viremia se presentó en ambas especies infectadas con las dos cepas desde el primer día postinoculación. En el caso de *Passer domesticus* inoculados con la cepa Tabasco los rangos de títulos de viremia se mantuvieron entre 2.4-8.4 log₁₀ UFP/ml (promedio pico de viremia= 7.8 log₁₀ UFP/ml) alcanzando el pico máximo de viremia el día 2; la duración de la viremia fue de tres días, en tanto que en el grupo de *Passer* infectado con la cepa Tecate se detectaron viremias con títulos que oscilan entre 2.3-10.1 log₁₀ UFP/ml, (viremia promedio = 9.5 log₁₀ UFP/ml) con viremia máximo el día 3. En este grupo la duración de la viremia fue entre cuatro y siete días. Es imperativo mencionar que la viremia se mantuvo constante y elevada en todos los sujetos que murieron como resultado de la infección en ambos casos.

Simultáneamente, *Quiscalus mexicanus* inoculado con la cepa Tabasco sostuvo viremias entre 2.5-10.2 log₁₀ UFP/ml, (promedio pico de viremia= 9.6 log₁₀ UFP/ml), ésta se mantuvo elevada y constante hasta la muerte de las aves resultado de la inoculación; entretanto *Quiscalus* infectados con Tecate conservó niveles de viremia entre 2.2 y 10.3 log₁₀ UFP/ml, (promedio pico de viremia= 9.3 log₁₀ UFP/ml) alcanzando el pico de viremia máximo el día 4 postinoculación. La duración fue de entre cuatro y siete días. Las diferencias en los promedios de las viremias entre las cepas inoculadas en la misma especie son estadísticamente significativas con una significancia del 0.05% analizadas con *t* de student. ($t=3.7 > 2.35$ valor teórico de *t* con 5 grados de libertad para el caso de *Passer*, $t=3.9 > 2.02$ valor teórico de *t* con 3 grados de libertad para el caso de *Quiscalus*).

El porcentaje de mortalidad más elevado que se observó en el estudio fue de 60% en el grupo de zanates inoculados con Tabasco. En contraste, la mortalidad en esta misma especie inoculada con Tecate solamente fue de 20%. La supervivencia se presenta en mayor proporción en los gorriones, observando mayor número de aves vivas al día 28 postinoculación con ambas cepas.

Con respecto al tropismo viral, los títulos más elevados se observan en aves de ambas especies inoculadas con la cepa Tecate; se hallan altas concentraciones en corazón, bazo, riñón, páncreas, piel y pulmón en el caso de *Quiscalus*; y en *Passer* se observan títulos elevados en hígado, bazo, pulmón, cerebro y piel.

La presencia de 100% de anticuerpos neutralizantes en las aves que sobrevivieron al día 28 del experimento, permite inferir en la factibilidad de una protección cruzada como respuesta a una segunda infección, al menos en estas

especies aviares en un corto periodo de tiempo. Sin embargo, debido a la temporalidad del experimento que no permite determinar cuánto podría durar esta protección. Conviene recomendar una siguiente investigación de más tiempo que proporcione esa información.

Se discute que ambas especies aviares en estudio son hospederos amplificadores para el VON, asimismo aunque hay datos importantes de serología positiva en equinos y aves en Chiapas hasta 2007 no se tiene noticia de que se halla presentado la enfermedad en humanos en la entidad.

Simultáneamente se analiza la importancia de estas aves en el medio ambiente, como hospederos amplificadores, considerándose que, al no tenerse un control estricto de la dinámica poblacional de la avifauna silvestre chiapaneca, éstas pudiesen convertirse en un factor de riesgo potencial para la salud pública, sugiriendo la posibilidad de que la Enfermedad del Virus del Oeste del Nilo pudiese presentarse en la entidad de manera abrupta.

Al llegar a observarse una mortalidad elevada se puede inferir que el virus esté circulando en la entidad. En este contexto se propone que podría utilizarse un monitoreo regulado de la mortalidad de estas especies como centinela potencial en las estrategias de vigilancia epidemiológica en la entidad.

Palabras clave: Virus del Oeste del Nilo, epidemiología de enfermedades emergentes, aves silvestres mexicanas, PRNT, Ensayo de placas.

I. INTRODUCCION

Los estilos de vida de los últimos 50 años aproximadamente han generado efectos indeseables a nivel mundial, particularmente en el medio ambiente. Existe evidencia de alteraciones severas en la ecología del planeta, ocasionadas por el calentamiento global; en particular los cambios climáticos afectan la ecología y producen variaciones en la conformación de la biomasa y en el comportamiento de los vectores artrópodos y los reservorios amplificadores de varias enfermedades. (Guzmán *et al.*, 2001) Este efecto supone modificaciones en la interacción entre especies. Por esta razón es indispensable mantener actualizado el conocimiento sobre la acción morbosa de agentes patogénicos, sus patrones de conducta y el comportamiento epidemiológico de varias enfermedades infecciosas emergentes. El conocimiento científico se convierte, de este modo, en insumo indispensable en la toma de decisiones para la realización de acciones oportunas de promoción de la salud, prevención y control de enfermedades.

Chiapas es una entidad fronteriza cuya población observa un nivel de escolaridad inferior al promedio nacional, dedicada en 65% a actividad productiva primaria; residente en un contexto natural de alta biodiversidad que se convierte en un entorno ecológico propicio para el desarrollo de brotes de enfermedades transmitidas por vectores. En el estado de Chiapas, entre varias enfermedades producidas por vector, se encuentran además del VON la Encefalitis Equina Venezolana, que se tiene evidencia de circular en la entidad hace varias décadas, detectada en aproximadamente 30% de la población de equinos además de otras especies de mamíferos silvestres; según reportes de investigación de Estrada-Franco, Roberto Navarro *et al.*, (2004)¹ realizada en la costa de Chiapas. Una enfermedad emergente, de la cual se sabe poco, sobre todo en México, es la enfermedad del Virus del Oeste del Nilo (VON). En particular, y con respecto al VON, la región chiapaneca debido a sus características ecológicas es una zona de alto riesgo que podría ser campo propicio para desarrollar brotes epizooticos y

¹ Información obtenida por comunicación personal, diciembre de 2007, abril de 2008.

generadores potenciales de daños a la salud humana. Esto sería no sólo por el riesgo inminente sino por la incertidumbre sobre aspectos vitales del comportamiento del agente etiológico en la región como ciclo de circulación viral, susceptibilidad de aves silvestres residentes de la región como posibles amplificadores del virus, entre otros. Considerando asimismo que el primer aislamiento del VON realizado en el sureste mexicano; sucedió en el colindante estado de Tabasco y que las condiciones ambientales, ecológicas y de biodiversidad son similares es importante no menospreciar el hecho de que en Chiapas ya se tiene evidencia serológica de la presencia del VON aunque no se ha realizado todavía ningún aislamiento viral.

La enfermedad causada por VON es viral de tipo vectorial, el agente etiológico es un flavivirus (familia Flaviviridae, género Flavivirus) y es transmitida por mosquitos entre los que destacan especies ornitofílicas (que se alimentan de sangre de aves y humanos) de los géneros *Culex*, *Aedes*, *Anopheles*, *Mimomyia* y *Mansonia*, al mismo tiempo las diversas aves y otros mamíferos hacen el papel de hospederos amplificadores, favorecen la multiplicación del agente etiológico y se convierten en un riesgo potencial para la salud pública (Kramer and Bernard, 2001; Kilpatrick *et al.*, 2006; Berrocal *et al.*, 2006).

La presencia del VON en Chiapas, se advierte a partir de publicaciones y observaciones hechas por investigadores que revelan datos sobre serología positiva en equinos, aves, e incluso un caso seropositivo en bovinos (Estrada-Franco²); y aunque todavía se desconocen los ciclos de circulación viral, vectores, reservorios aviares y cómo podrían enmascararse las manifestaciones de la enfermedad en humanos o en otros vertebrados por las características propias de la región; en esta zona se sabe de la existencia y circulación constante de otros flavivirus (i.e. dengue y encefalitis de San Luís) por lo que se toma como premisa

² Información obtenida por comunicación personal, enero de 2008.

del trabajo en esta investigación que no existen estudios patológicos y/o epidemiológicos que den cuenta de la situación de VON.

El objetivo de este estudio es conocer el comportamiento de dos especies de aves nativas en el estado: *Quiscalus mexicanus* (zanate mexicano) y *Passer domesticus* (gorrión doméstico) al ser infectadas con VON. Se evalúa la patogenicidad y virulencia de dos aislados mexicanos del Virus del Oeste del Nilo: cepa Tecate (BMC-04) y cepa Tabasco (TM171-03) en dos especies de la avifauna nativa de Chiapas.

El documento se estructura siguiendo los lineamientos de un informe académico, en las páginas iniciales se encuentra el resumen donde se describe de manera sucinta por qué, para qué y cómo se integró el estudio, incluyendo algunos resultados destacables. En el capítulo uno se localiza la información que introduce al lector al tema de la tesis, de tal forma que se alcance a percibir la trascendencia del fenómeno en estudio. A continuación, en la parte de marco teórico que corresponde al capítulo número dos, se reúnen los elementos indispensables para profundizar en el conocimiento de la enfermedad e importancia de este agente patógeno para la salud pública; estos elementos son comprendidos como los referentes disponibles para definir el estado del conocimiento sobre el tema.

En el siguiente capítulo, se definen los alcances y limitaciones del estudio, se aclara cómo fueron manejados los conceptos para traducirlos en unidades de medidas útiles y técnicamente comparables con los estudios realizados en otros sitios del mundo. Más adelante, en el capítulo cuatro, se encuentra detallada la metodología que se utilizó en el estudio experimental, con amplitud suficiente para posibilitar la replicación del experimento, asunto que es de vital importancia en la investigación científica. Por último en los capítulos cinco y seis se describe la información generada y procesada, se presenta conforme a los objetivos planteados y se analizan e interpretan los datos con fundamento en la literatura revisada.

La autora y colaboradores esperan que los resultados de este estudio sean útiles en la medida en que incrementen el conocimiento sobre el comportamiento, virulencia, patogenicidad y posible evolución del Virus del Oeste del Nilo al estarse adaptando al neotrópico, al aportar elementos científicos que apoyen las decisiones de adoptar medidas específicas sobre la promoción de la salud, de prevención y control efectivos para la detención y disminución de los riesgos de enfermar y morir, aspectos que tendrían impacto positivo de orden epidemiológico, económico y social.

II. MARCO TEÓRICOS

Agente etiológico: Virus del Oeste del Nilo

Entre los estudios más destacados están el de Vallés (2000) realizado a través del Instituto municipal de la salud en Barcelona, España; el de Izaguirre *et al.*, (2003) en Cuba; donde se describe el comportamiento clásico del virus en su interacción con otras especies; el de Petersen *et al.*, (2003) en los Estados Unidos de Norteamérica donde se presenta la descripción detallada del virus con base en experiencias clínicas; Salim *et al.*, (2005), en Colombia, realiza un trabajo utilizando técnicas de ELISA e inmunofluorescencia y demuestra la existencia de cierta complejidad en el serodiagnóstico.

Para conocer la prevalencia de la infección por el VON y otros virus de transmisión similar en la población humana de Delta del Ebro, España; Lozano y Filipe (1998) en diez localidades de la región analizaron 1037 muestras de suero para determinar presencia de anticuerpos, con la técnica de la hemoaglutinación (IHA) y en algunos casos se estudió la presencia de IgM; encontrando que el 8% de las muestras reaccionó frente a antígenos de VON.

En la región sureste de México, la Secretaría de Salud del Estado de Tabasco (Garrido *et al.*, 2004) realizó un estudio serológico de arbovirus en población expuesta de municipios en riesgo; se utilizó la técnica de inmunofluorescencia (fijación de anticuerpos IgG e IgM) y se logró identificar una reacción positiva al VON en un 61% (8 sujetos de entre 18 incluidos en la muestra).

En Estados Unidos de Norteamérica, efectúan un estudio experimental exponiendo a 25 especies aviares diferentes con la cepa NY99, a través de la picadura de mosquitos infectados; con el objetivo de monitorear títulos de viremia, resultados clínicos, liberación viral en cavidades cloacal y oral, persistencia de la infección viral en órganos y el desarrollo de anticuerpos neutralizantes. Los investigadores de este grupo determinan que los Passeriformes y Charadriiformes son los reservorios más competentes, ya que desarrollaron los más altos niveles de viremia y diseminan las más elevadas descargas virales en fluidos cloacal y

oral. Las viremias excedieron títulos de más de 10^6 PFU/ml y suficientes para infectar mosquitos (Komar *et al.*, 2003, Hayes *et al.*, 2005).

En estudios experimentales conducidos con las cepas de VON del viejo mundo de Kenia y Australia (Kunjin) y la de Norteamérica (NY99) se inocularon 32 *Corvus brachyrhynchos* (cuervo americano) colectados en el Estado de Kansas (Brault *et al.*, 2004). Entre los resultados se reportó que los cuervos inoculados con NY99 alcanzaron altos niveles de viremia (9.2 UFP/ml) y la muerte (100%); mientras que aquellos inoculados con la cepa keniana y kunjin desarrollaron viremias más bajas (7.5 UFP/ml y 4.2 UFP/ml respectivamente y mínima mortandad, pero generaron anticuerpos neutralizantes capaces de proveer 100% de protección contra la cepa NY99). Esto sugiere que las alteraciones genéticas de esta cepa son responsables por el fenotipo virulento en los cuervos y que incrementan la posibilidad de que se propague más rápidamente en Norteamérica

En experimentos similares con *Passer domesticus* y cepas NY99, KUN y KEN, donde se inocularon a ocho sujetos de estudio por cepa, se observaron perfiles elevados de viremia con las cepas NY99 y KEN (5.6 y 10.8 UFP/ml, respectivamente) y tasas de mortalidad elevadas (50%), concluyen que las cepas de Nueva York (NY99) y Australia (KEN) son análogas (Langevin *et al.*, 2004).

En Colorado, Nebraska, efectuaron un estudio experimental similar infectando a cinco especies de aves rapaces, a través de la picadura de mosquitos infectados con el VON; los resultados reportaron infecciones de 5 días postinoculación, con picos de viremia entre 3.6 UFP/ml y 7.8UFP/ml; entre los hallazgos de las lesiones histopatológicas reportaron miocarditis subagudas y encefalitis, no obstante no se registraron manifestaciones clínicas (Nemeth *et al.*, 2006).

En Colombia realizan una investigación con la finalidad de discutir la importancia que tiene el VON para la salud animal, considerando el posible impacto por la introducción de este agente patógeno al continente sudamericano dada la biodiversidad presente en la región (Peña *et al.*, 2005).

Después de revisar toda la información registrada del VON en América Latina y el Caribe, algunos investigadores concluyen que los informes esporádicos

de la enfermedad equina, humana y aviar son desconcertantes y sugieren la necesidad de aislar las cepas para determinar si la atenuación del virus u otro factor explica la reducida carga de enfermedad en ecosistemas tropicales (Komar and Clark, 2006).

En Virginia, EEUU efectuaron análisis utilizando técnicas moleculares de Real Time Reverse Transcriptasa Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) en 61 especies de aves rapaces, resultando 40 positivas a VON (Joyner *et al.*, 2006).

En el noreste de México se efectuó un estudio con el fin de detectar la presencia del virus en aves, equinos y seres humanos; utilizando las pruebas de Elisa de bloqueo y de Elisa de captura respectivamente; así como la prueba de neutralización de reducción de placas (PNRP) aplicadas en muestras de aves y RT-PCR para muestras de sueros en humanos. Se encontraron aves seropositivas para VON, entre ellas *Passer domesticus* (gorrión doméstico), *Spizella palida* (gorrión color arcilla) y *Zonotrichia leucophrys* (gorrión de corona blanca) detectando presencia de anticuerpos. Reconocidas como especies migratorias con hábitos invernales en México (Fernández *et al.*, 2007).

El virus del Oeste del Nilo está serológicamente relacionado con el complejo de la encefalitis Japonesa de los flavivirus (familia Flaviviridae, género Flavivirus) que incluye, entre otros, el de la encefalitis de St. Louis (SLE) en Norte y Sudamérica; el de la encefalitis Japonesa en Asia y de la encefalitis del valle del Murray en Australia (Mackensie *et al.*, 2004).

En el Continente Americano, a partir de su aislamiento en Estados Unidos, en el año 1999 y en México en el 2003, el VON se ha considerado como un patógeno emergente en la salud pública.



Figura 1 Estructura del Virus del Oeste del Nilo. Tomada de <http://www.rkm.com.au/VIRUS/>

El VON es casi esférico, simétrico, con un diámetro aproximado entre 40 y 60 nanómetros, conteniendo un denso núcleo (core) de aproximadamente 30 nm de diámetro; rodeado por una bicapa lipídica, considerado uno de los más pequeños; compuesto por una nucleocápside icosaédrica y una envoltura. Contiene un genoma de cadena simple de ARN de sentido positivo, de aproximadamente 11 mil nucleótidos. Esta partícula vírica está asociada con tres proteínas estructurales: 1) E (envoltura), 2) M (membrana) y 3) C (cápside); (Fields, 2001; Hirose, 2002; Montaña, 2002; Izaguirre *et al.*, 2003; Cubría 2004) (ver figuras 1 y 2).

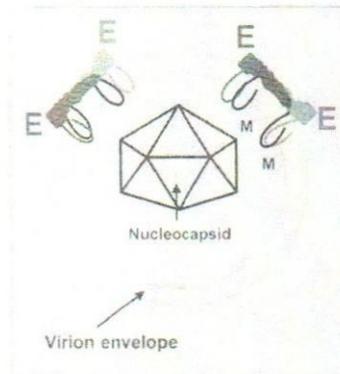


Figura 2 Diagrama de un virion de flavivirus. Una nucleocápside helicoidal encierra el virión de RNA. Tomada de Pertersen (2001)

La estructura inmunológica más importante es la proteína E- glicoproteína que es la sustancia neutralizadora de los anticuerpos. El genoma del virus consiste de 5 regiones no codificadas (NCR; 100 nucleótidos), una simple abertura lee el esqueleto codificado de tres estructuras proteicas virales – (C), (M), (E), siete proteínas no estructurales, y 3 regiones no codificadas (600 nucleótidos) – (Cubría *et al.*, 2004) (ver figura 3).

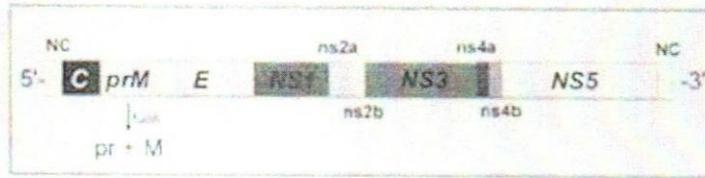


Figura 3 Estructura genómica de flavivirus. Tomada de Petersen, 2001

La replicación viral ocurre en el citoplasma, en estrecha relación con el Retículo Endoplásmico Rugoso. (Izaguirre *et al.*, 2003)

VON utiliza proteínas celulares durante su ciclo de replicación para el proceso de fijación, entrada, traducción, transcripción, replicación y ensamble. Se une a proteínas específicas (desconocidas hasta el momento) en la superficie de la célula y entra a ésta en una vesícula; mediante un proceso similar a la endocitosis. Aún no se conoce exactamente cómo se desarrolla el proceso de unión del virus a la célula, sin embargo se ha descubierto que es probable que sea promovida a través de la interacción inicial de la proteína estructural E con residuos sulfatados en la célula de sulfato de heparán (HSHS). Una vez dentro se cree que un descenso en el pH es la causa para que se modifique esta proteína que expone su dominio hidrofóbico, lo que permite la fusión entre la partícula viral y la membrana celular huésped (Fields, 2001).

Después, el genoma simple de RNA es liberado en el citoplasma y se efectúa la traducción; el RNA positivo actúa como RNA mensajero, es traducido por ribosomas en una poli proteína viral, posteriormente las proteínas virales maduras son producidas por vía de la división proteolítica, que incluye tres componentes estructurales y siete no estructurales del virus (ver figura 4).

Enfermedad del Virus del Oeste del Nilo.

Conocida también como Fiebre del Oeste del Nilo, es una enfermedad cuyos ciclos en la naturaleza se mantienen por lo general en el contexto mosquito-ave-mosquito, involucrando ampliamente a varias especies de pájaros como hospederos vertebrados primarios. Además de las aves afecta también a equinos, otros mamíferos y sólo ocasionalmente al humano. Éste es considerado hospedero incidental. La enfermedad es generalmente transmitida por la picadura de mosquitos del género *Culex* (entre otras). Afecta principalmente al sistema nervioso central y se manifiesta por un curso febril agudo con síntomas neurológicos como dolor de cabeza y ojos, fatiga, náusea, dolor muscular, debilidad generalizada, vómito y diarrea (Hayes *et al.*, 2005). El riesgo de contagio aumenta con la inmunosupresión, asociada muchas veces a la edad del paciente.

En las últimas dos décadas del siglo XX, de acuerdo con la *Epidemic and Pandemic Alert and Response* (EPR de la Organización Mundial de la Salud, 2007), surgieron cerca de 20 enfermedades nuevas en el mundo, que afectan a los seres humanos, la mayoría de origen zoonótico, entre ellas la Fiebre del Oeste del Nilo, que constituye en la actualidad una amenaza real para la población de las Américas.

El principal periodo de ocurrencia es de julio a septiembre; sin embargo han ocurrido casos de mayo a diciembre. (Torpy, 2003)

En los casos observados hasta el 2002, los epidemiólogos han reconocido varios modos de transmisión (Carrada, 2004):

a) Por la picadura de mosquitos infectados, la más frecuente;

b) Una embarazada, infectada en el segundo trimestre, hizo la transmisión transplacentaria al feto, quién al término desarrolló coriorretinitis, daño neurológico grave y presencia de IgM en el suero y en el líquido cefalorraquídeo, positivos al VON;

c) Transmisión a través de la leche materna, cuando una madre lactante se infectó por transfusión sanguínea, el bebé permaneció asintomático, desarrolló anticuerpos;

d) Se han reconocido dos casos ocupacionales en laboratoristas, por inoculación percutánea accidental.

La enfermedad se produce posterior a la picadura del mosquito infectado, cuando éste se alimenta de la sangre del hospedero le inyecta el virus a través de la saliva; el VON inicialmente se replica en piel y ganglios linfáticos regionales, infecta quizás fibroblastos y células del endotelio vascular generándose, entonces, la viremia primaria en el sistema retículoendotelial. En la viremia secundaria se disemina a sistema nervioso central (Carrada, Cubria y Mackenzie, 2004) (ver figura 6).

En pacientes aparentemente sanos, el virus ha sido aislado en suero colectado días antes de iniciados los síntomas, pero la viremia desapareció una vez que los títulos de anticuerpos IgG e IgM neutralizantes del VON se elevaron; los enfermos inmunodeprimidos suelen tener viremias mucho más extensas; de hasta 31 días. Sin embargo aún no se conocen con certeza todos los aspectos de la patogénesis.

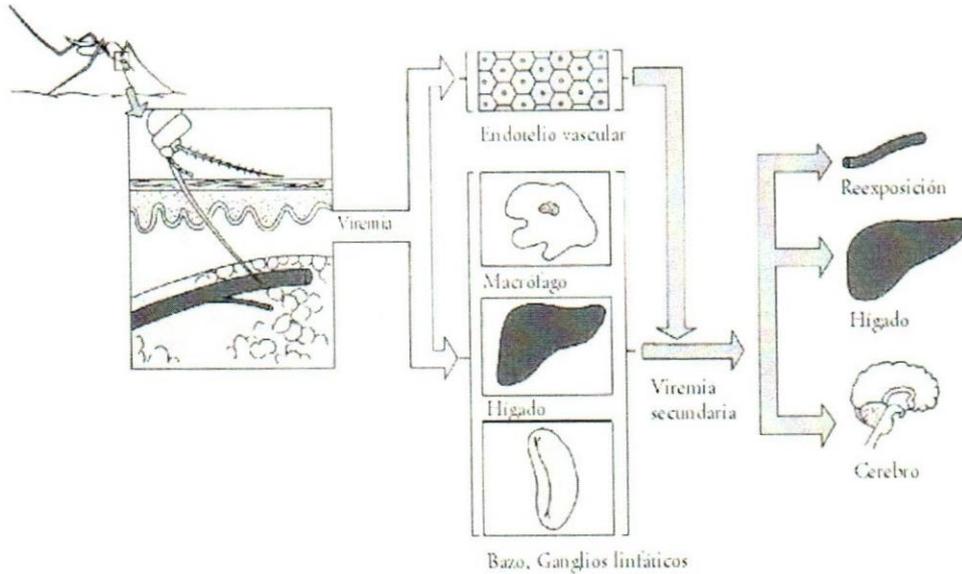


Figura 6 Esquema de patogénesis del Virus del Oeste del Nilo. Tomado de Cubria, *et al.*, 2004.

Después de un periodo de incubación de 3 a 14 días, un caso leve de la enfermedad comienza con fatiga y fiebre súbita, posteriormente cefalea, mialgias y edema en ganglios linfáticos que pueden durar varias semanas. En casos más severos la fiebre y cefalea suelen ser más intensos, existe además dolor muscular,

rigidez de cuello, estupor, confusión, delirio, convulsiones, inclusive parálisis. (Dieguez *et al.*, 2003; Torpy, 2003; Berrocal *et al.*, 2006).

Aproximadamente 80% de los humanos infectados con VON no presentan signos de enfermedad, durante los recientes brotes y con base en estudios serológicos sugieren que 20% de los individuos infectados desarrollan manifestaciones de enfermedad febril; pero uno en 150 personas infectadas desarrollan severos síntomas de la enfermedad como encefalitis o meningitis. (Gubler y Petersen, 2002; Zielinski, 2004).

Otras manifestaciones clínicas pueden ser faringitis, congestión conjuntival, dolor ocular, náusea, vómitos, dolor abdominal, rash cutáneo sin comezón (en tórax, espalda y miembros), debilidad y desorientación. Pocos pacientes desarrollan meningoencefalitis, encefalitis y/o hepatitis. (Brinton, 2002; Izaguirre *et al.*, 2003).

En casos más severos se han reportado miocarditis, pancreatitis y hepatitis. (Mackenzie, *et al.*, 2004).

El diagnóstico se confirma con más eficiencia a través de una prueba que constate la presencia del agente etiológico.

Existen dos pruebas básicas de diagnóstico; la primera elección, (probablemente por accesibilidad) es el estudio de serología, sin embargo el diagnóstico más específico es la detección viral. La prueba serológica preferida es la inmunoenzimática (ELISA: enzyme-linked-immunosorbent-assay) para IgM o la prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes (IFA) y se usa la prueba de reducción de placas para confirmación; utilizando suero sanguíneo o líquido cefalorraquídeo (Petersen *et al.*, 2003).

Los métodos para detectar el virus son la transcripción inversa seguida de reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR: reverse-transcription-polymerase-chain-reaction); amplificación basada en la secuencia de ácidos nucleicos (NASBA: nucleic-acid-sequence-based-amplification) o aislamiento del virus en cultivo celular.

A través de un estudio con cuervos americanos se observó que el uso de la prueba de Vec Test puede llegar a ser utilizada eficientemente en campo para

diagnosticar la presencia de VON a partir de muestras de heces fecales, saliva o tejidos de aves muertas en campo (Yamerich *et al.*, 2003).

Después del brote que se presenta en Nueva York en 1999, investigadores evalúan la misma prueba; de abril 2003 a julio 2004; a través de muestras de hisopos orales y tejidos de aves muertas, confirmando los positivos con RT-PCR, determinan que esta prueba es eficiente y adecuada para la vigilancia de VON en especies como cuervos americanos, (*Corvus brachyrhynchos*) (87%), azulejos (*Cyanocitta cristata*) (80%) y gorriones domésticos (*Passer domesticus*) (76%) (Stone *et al.*, 2004).

Las medidas de prevención de esta enfermedad conciernen únicamente al control y protección contra la picadura de los mosquitos (Gubler and Petersen, 2002).

Considerando que las manifestaciones clínicas son generales, es conveniente mencionar que, para realizar el diagnóstico diferencial resulta imprescindible que el personal médico tenga presente la entidad patológica, lo cual es posible únicamente cuando la literatura reporta información epidemiológica relevante.

A partir del año 2000 se estableció oficialmente en México la vigilancia epidemiológica para VON. Se han efectuado estudios serológicos en algunos estados del país donde se informa de tasas de prevalencia en caballos, desde 62.5% en Coahuila hasta 1.2% en Yucatán (Ramos, 2004).

Para el año 2003 se obtuvo el primer aislamiento del virus en un cuervo (*Corvus corax*) muerto en el parque ecológico Yumká de Villahermosa, Tabasco. La secuencia nucleotídica del genoma viral de la cepa TM171-03 mostró una divergencia genética distinta a la del genoma prototipo NY99 aislado en EEUU (Estrada-Franco *et al.*, 2003; Beasley *et al.*, 2004). Más aún, diferencias detectadas en las proteínas estructurales prM-E y estudios experimentales en modelos murinos (modelos animales, básicamente roedores) asocian específicamente cambios en dos aminoácidos con una posible atenuación en la virulencia de la cepa Mexicana de Tabasco con respecto a la NY99 (Beasley *et al.*, 2004). El análisis nucleotídico y filogenético del aislado más reciente reportado del VON en

la ciudad de Tecate, Baja California en el año 2004 (BCM-04) obtenido también de *Corvus corax*, presenta diferencias comparando el genoma completo de tres aminoácidos con la cepa de NY99 y siete aminoácidos con respecto a Tabasco (TM171-03) y se asocia filogenéticamente con cepas circulantes en el Valle Imperial del estado de California en EEUU, durante el año 2003 (Deardorf *et al.*, 2005). La presencia de diferencias nucleotídicas de ambas cepas (BCM-04 y TM171-03) sugerirían diferencias genotípicas y fenotípicas que podrían afectar el grado de neuro-virulencia y neuro-invasión en hospederos potenciales.

Estos resultados sugieren diferencias genotípicas y fenotípicas en las cepas BMC-04 (Tecate, Baja California) y TM171-03 (Tabasco) de VON aisladas en la República Mexicana respecto al prototipo NY99, aislado en Nueva York, ya que existen discrepancias substanciales entre las dos cepas mexicanas (Beasley *et al.*, 2004; Deardorff, *et al.*, 2005).

La patogenicidad de cada cepa puede estar relacionada con los nucleótidos que codifican para regiones específicas en las proteínas estructurales prM, E o no estructurales de este virus (Hayes *et al.*, 2005).

Se ha informado de seis casos humanos con diagnóstico confirmado de infección por el VON en los estados de Chihuahua, Nuevo León y Sonora; tres fueron clasificados como Fiebre del Nilo del Oeste (FNO) y tres presentaron encefalitis. Hasta ahora no se han reportado casos letales por esta causa (Ramos, 2004) salvo un caso en el estado de Coahuila donde se registró la defunción de un anciano que regresó de Texas enfermo por esta causa; se reportó como un caso importado (Cubría *et al.*, 2004).

Admitiendo que el virus circula en el país, aunque la tasa de infección sea mínima de acuerdo con los registros de monitoreo, no se explica por qué no se han desarrollado más casos. Se han planteado algunas hipótesis para explicar la discrepancia, porque existe la enfermedad en Estados Unidos de Norteamérica y no en México; motivo por el cual el estudio de este patógeno es relevante en dos de sus hospederos amplificadores aviares potenciales.

Este virus fue diagnosticado por vez primera en el Distrito del Nilo Occidental de Uganda en el año 1937, de ahí su nombre. Las primeras epidemias

registradas de la fiebre del Oeste del Nilo ocurrieron en Israel durante 1950-59, reconociendo a este virus como causante de la meningoencefalitis humana grave (Petersen *et al.*, 2001; Huhn *et al.*, 2003).

Posteriormente se observó su presencia en Egipto, India y algunas áreas de África; en el año 1974, ocurrió la epidemia más grande en Sudáfrica, en una extensión de terreno de 2,500 km² con miles de personas infectadas (Rivero, 2006). Es biológicamente plausible que en esas regiones la población sea potencialmente más vulnerable por las condiciones de vida que presentan; condiciones de pobreza extrema, hambruna y desnutrición podrían ser tal vez, factores predisponentes para la aparición de enfermedades como ésta.

En el año 1994 se presentaron brotes de encefalitis vírica de Nilo en humanos en Argelia; Rumania en 1996-1997; República de Checoslovaquia en 1997; El Congo en 1998; Rusia en 1999; Estados Unidos en 1999-2000 e Israel en el año 2000. En las Américas, la primera epidemia registrada ocurrió en la metrópoli de Nueva York al final del verano de 1999. Se notificó un total de 62 casos de enfermedad neurológica y 7 defunciones.

Además de afectar seres humanos, ocurrieron epizootias concurrentes en aves y caballos, atacando de manera especial al cuervo común (*Corvus corax*); durante esta epidemia/epizootia, el virus se detectó en otros 3 estados de USA: Connecticut, Maryland y New Jersey (Huhn, 2003). En 2000, hubo 18 casos y una muerte registrados y una actividad epizootica en las aves y/o mosquitos en 13 estados de Estados Unidos de Norteamérica (Connecticut, Delaware, Maryland, Massachusetts, Nuevo Hampshire, New Jersey, Nueva York, Carolina del Norte, Pensilvania, Rhode Island, Vermont, Virginia y el Distrito de Columbia (OPS, 2000).

En los Estados Unidos Mexicanos, hacia el año 2003, en 24 estados se presentaron casos clínicamente sospechosos en 604 personas en quienes se realizaron pruebas de laboratorio para la detección del VON, de los cuales seis fueron seropositivas (entre 15 y 64 años; 3 con síntomas neurológicos graves), 2,630 equinos y 147 aves seropositivas. Por RT-PCR fueron positivos 1 humano, 2 equinos y 10 aves (CDC, 2004).

En el mismo año 2003, los estados con mayor tasa de infección en équidos fueron Chiapas (61%), Quintana Roo (59%) y Jalisco (57%); se identificó que el estado con la mayor tasa de infección en las aves (9%) fue Tabasco (Blitvich *et al.*, 2003).

En el año 2005 la Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras enfermedades Exóticas de los animales (CPA) en colaboración con el Centro de Control de Enfermedades de Estados Unidos (CDC) y la Universidad de Texas en Galveston (UTMB) (Estrada, *et al.*, 2005³) reportan serología positiva en equinos para VON en Chiapas 22 casos (24.18%). Mientras que los porcentajes más elevados de seropositividad también en equinos, se localizan en los estados de Baja California Sur y Chihuahua (54.17 y 55.95% respectivamente).

Han sido reportados en el año de 2005 siete casos de VON en humanos, en los estados de Chihuahua (cuatro), Coahuila (uno), Nuevo León (uno) y Sonora (uno) (SSA, México, 2005).

Para el año 2006 se registran casos positivos en equinos en 21 estados del país, mientras que en 8 estados (Baja California, Baja California Sur, Oaxaca, Sinaloa, Chihuahua, Sonora, Nuevo León y Tamaulipas), se registran casos positivos para VON en aves (*Passer domesticus*; entre estas especies) (CPA, UADY, UANL, CENACEVE Y SEMARNAT, 2006).

Es interesante reconocer la importancia que guarda esta enfermedad en la Salud Pública, ya que aun cuando no se ha presentado ningún brote en ninguna especie en México no se debe descartar la posibilidad de que llegue a existir.

Vectores

Por sus características fisiográficas en Chiapas se conjugan varios factores de riesgo que potencialmente proveerían las condiciones para el desarrollo de los vectores portadores de este virus. Entre ellos la riqueza hidrológica y los ecosistemas acuáticos adecuados para la estancia temporal de aves migratorias,

³ Información obtenida por comunicación personal con el autor, 2005

especies de las que se alimentan varios tipos de mosquitos ornitofílicos. Conviene señalar que aún cuando no se sabe con certeza cuál es el mecanismo de entrada del virus a cada país, se confiere esta función a la migración de aves portadoras del VON. De manera que las aves migratorias son consideradas principales reservorios u hospederos amplificadores potenciales, razón que justifica la prioridad de este estudio. Aún cuando las especies de estudio sean endémicas, no debe inadvertirse el contacto que pueda existir con aquellas que son migratorias. Con base en investigaciones, se asegura que las aves silvestres, domésticas y/o en cautiverio son las especies responsables de la introducción del virus en el nuevo mundo, por migración normal, desplazamiento debido a condiciones atmosféricas y/o la importación legal o ilegal (Rappole y Hubalek, 2000 y 2003).

Al identificar la dinámica que existe entre los posibles hospederos aviares amplificadores del virus y los vectores sería posible considerar medidas de control y prevención para contrarrestar o evitar futuros brotes en el país, protegiendo la salud y la vida humana, además del equilibrio ecológico (Haydon *et al.*, 2002).

El movimiento de patógenos, vectores y animales hospederos representan un factor de influencia prioritaria en la epidemiología de las zoonosis con respecto a su reservorio silvestre, esto imprime otro rasgo de importancia a la migración de aves como factor relevante en la propagación del VON (Kruse, 2004).

Asimismo es importante notar la presencia de otros flavivirus circulantes en el país, que hipotéticamente estén provocando un enmascaramiento de la enfermedad (VON) debido a la reacción cruzada. Cuando el humano se infecta con un flavivirus, diferente al VON, desarrolla anticuerpos neutralizantes que a su vez, si son diferentes al VON, atenuarían la respuesta serológica del hospedero y prácticamente impedirían conocer a ciencia cierta la infección dominante actual de la memoria histórica serológica. Este fenómeno ha sido estudiado en detalle por Halstead con otros flavivirus, en particular dengue y se conoce como el pecado original de los virus ("Sin effect") (Estrada-Franco)⁴.

Los mosquitos ornitofílicos son los principales vectores de la enfermedad del VON, insectos voladores que se alimentan de sangre de aves y humanos.

⁴ Información obtenida por comunicación personal con el autor, mayo de 2007.

Únicamente las hembras de los mosquitos son hematófagas, hábito indispensable para la reproducción. *Culex* (mosquito casero de Norteamérica) y los géneros *Aedes*, *Anopheles*, *Psorophora*, *Coquilletidia*, *Mimomyia* y *Mansonia* son los principales géneros de mosquitos que se han relacionado con el VON, por aislamiento del virus en África, Asia y Estados Unidos de América; *Culex* es el más susceptible de infectarse (Brinton, 2002; Cubría *et al.*, 2004).

El Centro de Control de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos de América han listado y confirmado como positivos al virus, 756 pools de mosquitos, 22 especies diferentes que incluyeron hasta 2001: *Aedes albopictus*, *A. cinereus*, *A. vexans*, *Anopheles punctipennis*, *A. quadrimaculatus*, *Coquilletidia perturbans*, *Culex pipiens*, *Cx. restuans*, *Cx. nigrigalpus*, *Cx. quinquefasciatus*, *Cx. salinarius*, *Culiseta melanura*, *Ochlerotatus canadensis*, *Oc. cantator*, *Oc. japonicus*, *Oc. sollicitans*, *Oc. trivittatus*, *Oc. signifera*, *Psorophora columbiae* y *Uranotaenia sapphirina* (Vargas *et al.*, 2002).

Se han evaluado en California diez especies de mosquitos; entre ellas *Culex tarsalis*, *Cx. pipiens pipiens*, *Cx. pipiens quinquefasciatus*, *Cx. stigmatosoma*, *Cx. erythrothorax*, *Ochlerotatus dorsalis*, *Oc. melanimon*, *Oc. sierrensis*, *Aedes vexans* y *Culiseta inornata* como vectores para Virus del Oeste del Nilo, como resultado relevante se observó que *Ochlerotatus*, *Culiseta* y *Aedes* fueron mínimamente eficientes como vectores; mientras que *Culex stigmatosoma*, *Cx. erythrothorax* y otras poblaciones de *Cx. pipiens* son las mejores especies que juegan un rol importante primario en el mantenimiento enzootico y transmisión de la enfermedad, al menos en aquella región de EEUU (Goddard *et al.*, 2002).

Estudios efectuados en Texas determinan que la preferencia alimentaria del *Culex quinquefasciatus* es básicamente sangre de mamíferos (52.5%), aves (34.8 % entre ellas *Passer domesticus*) y de ambos (8.3%), asociando a esta especie aviar en el ciclo de transmisión del VON como reservorios amplificadores del virus (Molaie *et al.*, 2007).

Los principales factores del nicho ecológico de los vectores son lluvia intensa, presencia de encharcamientos, alta humedad relativa ambiental y una temperatura elevada del medio ambiente (Turell *et al.*, 2001; Vargas *et al.*, 2002).

El medio acuático es el principal hábitat para la reproducción de mosquitos. La hembra oviposita en el agua, entre seis a siete días más tarde eclosionan liberando larvas muy activas donde permanecen de una a tres semanas, de acuerdo a la temperatura acuática. El periodo de pupa puede durar hasta cinco días y de ésta emerge el mosquito adulto, los mosquitos de *Culex* son más activos entre el crepúsculo y al amanecer en EEUU y Canadá, sin embargo en el neotrópico la actividad inicia desde el atardecer.

Turell *et al.* (2000) demuestran a través de estudios experimentales; utilizando quince especies de mosquitos colectados en New York después del brote de 1999 y alimentándolos con sangre de gallinas infectadas con VON; que la especie más altamente susceptible a la infección es *Culex pipiens*, en contraste *Aedes vexans* es moderadamente menos susceptible a la infección oral.

Hospederos Amplificadores

Reservorio es una o más poblaciones y/o medio ambiente que se encuentran conectados, en donde el ente patógeno tiene la capacidad de mantenerse viable, permitiendo que la infección se transmita a determinada población blanco (Haydon *et al.*, 2002).

El VON tiene una variedad poco usual de hospederos que incluye más de 150 especies de aves y a 18 o más especies de mamíferos y vertebrados, entre perros, gatos, caballos, ardillas y caimanes (Lanciotti, CDC; documento traducido por Hirose, 2003).

Las aves migratorias han sido considerados los principales hospederos amplificadores introductorios del VON en nuevas regiones ya que los brotes han coincidido con el arribo de altas concentraciones de aves y mosquitos ornitofílicos en días del inicio de verano. Además se ha aislado el VON de varias especies de estos mosquitos y anticuerpos neutralizantes de este virus se han encontrado en la sangre de diversas aves migratorias. (Rappole *et al.*, año 2000).

Se ha detectado VON en más de 150 especies de aves silvestres y domésticas, siendo las del orden Passeriformes las más susceptibles, éstas desarrollan las más altas viremias así como descargas elevadas de virus a través

de fluidos cloacal y oral. (Komar *et al.*, 2003; Peña *et al.*, 2005; Van Der *et al.*, 2005). En EEUU Komar, 2003, reporta que en el año 2002, se atribuye mortalidad por infección por el Virus del Oeste del Nilo en 198 especies aviares de Norteamérica, entre las que se mencionan a *Passer domesticus* y *Quiscalus mexicanus*

También las especies de los órdenes Charadriiformes y Anseriformes (por ejemplo el ganso doméstico) son altamente susceptibles a esta infección. Por el contrario las Psittacines y Gallinaceous son las menos susceptibles (Van Der *et al.*, 2005).

Se ha experimentado con gallinas domésticas inoculadas con la cepa NY99, para evaluar la susceptibilidad, duración e intensidad de la viremia y respuesta serológica; reportan que esta especie no desarrolla la enfermedad clínica, sin embargo desarrolla anticuerpos neutralizantes y los títulos de viremias detectadas no son capaces de lograr infectar al vector, por lo cual esta especie resulta ser excelente para utilizarse como centinela en programas de vigilancia (Langevin *et al.*, 2000).

Las viremias elevadas y a largo plazo observadas en las especies aviares silvestres permiten la transmisión de VON a los mosquitos y las migraciones de estas aves son fundamentales en la introducción del virus en áreas que no han sido afectadas; de forma paralela una amplia gama de vertebrados son susceptibles de adquirir la enfermedad, sin embargo adquirirla de manera natural es muy raro. Con excepción de los equinos, quienes desarrollan encefalitis como causa de la infección natural por VON. (Van Der *et al.*, 2005).

Por otro lado se han detectado anticuerpos contra este agente etiológico en al menos 30 especies diferentes de vertebrados como mamíferos; incluyendo animales de granja, silvestres, y mascotas. La seroprevalencia parece ser más elevada en aquellas regiones donde el virus ha circulado por décadas. Esta característica puede depender de las especies de vertebrados que han resultado seropositivas; la diferencia en la seroprevalencia puede estar relacionada con la susceptibilidad de las especies, a condiciones medioambientales (exposición a mosquitos) y/o a otros factores desconocidos comprometidos con la patogénesis

de la infección (Komar, 2003; Peña *et al*, 2005). El Center for Diseases Control (CDC) ha reportado infecciones de este virus en 29 especies de mamíferos incluyendo ardilla (*Tamias striatus*), mofeta de rayas (*Mephitis mephitis*), zorro ardilla (*Sciurus niger*), ardilla gris (*Sciurus carolinensis*), lobo gris (*Canis lupus*), oveja (*Ovis domesticus*), cabra de montaña (*Oreamnos americanus*), murciélago frente grande (*Eptesicus fuscus*), foca (*Oryctolagus cuniculus*), gato doméstico (*Felis domesticus*) y perro (*Canis familiaris*). (Marra *et al.*, 2004).

Han sido identificados casos clínicos de VON, en distintas especies de aves y mamíferos en 44 de los 50 Estados de Norteamérica; en 5 distritos de Canadá y al menos en 19 de los 31 estados de la República Mexicana.

En Illinois, EEUU diagnosticaron a dos cánidos con VON, a través de signos como encefalitis y miocarditis, confirmando la infección con inmunohistoquímica y PCR (Lichtensteiger *et al.*, 2003).

Especies aviares chiapanecas en estudio

Conviene mencionar que tanto *Quiscalus mexicanus* como *Passer domesticus* son especies residentes abundantes del estado de Chiapas, se infiere que sean fuertemente competentes como amplificadores de este virus y están distribuidas en un amplio rango geográfico, lo que favorece la exposición al agente etiológico en caso de existir el vector y el ambiente adecuado para el desarrollo de un brote epidémico.

Cabe recalcar que la presencia cosmopolita y abundante de ambas especies en territorio mexicano y su endemidad manifiesta han sido algunas de las causas que justifican este estudio. Como se señaló anteriormente, la evidencia serológica histórica, los aislamientos virales en particular de los passerinos (*Passer domesticus*) y los estudios experimentales donde se han infectado ictéridos (*Quiscalus quiscula*) con VON son suficientes elementos para estudiar el posible papel de ambas especies en los ciclos del Virus del Oeste del Nilo en México.

Para el país, específicamente para el estado de Chiapas, *Quiscalus mexicanus* (zanate común) es un enigma, y se sospecha que pueda ser altamente susceptible, como el *Corvus corax* (cuervo común), a desarrollar viremias elevadas e infectar a los vectores antes de morir. *Passer domesticus* (gorrión casero), especie cosmopolita; y aún cuando el rango de vuelo no es muy alto, de acuerdo con los estudios experimentales realizados por Komar *et al.*, (2003) en Nueva York, ha sido considerado como excelente reservorio amplificador de la cepa original NY99, razón que hace relevante conocer el comportamiento de esta especie con respecto a los virus autóctonos mexicanos aislados hasta el momento en el País.

Zanate común (*Quiscalus mexicanus*)

Es reconocido por nombres comunes como zanate común, zanate mayor, chanate, tordo grande, urraca, grajo, mulato (en Guanajuato), tordo Macho (en San Luis Potosí), clarinero (en Chiapas), acazanate, tzánatl (en náhuatl), itzlaolzanate, pájaro prieto, papate, picho (en Tabasco), zocao, cahuix (en Campeche), yuyum, yuya, k'au (en maya) (Sada *et al.*, 1995; Birkenstein y Tomilson, citados por SEMARNAT y CONABIO, 1997). Pertenece al orden de los Passeriformes y a la familia de los Icteridae.

Históricamente la especie más encontrada en Centro y Sudamérica, pero alteraciones generadas por los asentamientos humanos han propiciado que estas aves se expandan hacia Estados Unidos y Canadá. (Christensen, 2000).

El macho de esta especie tiene una altura de 34.5 a 47.0 centímetros, pesa 190 gramos; en tanto que la hembra mide entre 26.5 y 31.5 centímetros y llega a pesar 109 gramos. El primero presenta un color negro a morado, iridiscente en dorso y pecho, con cola amplia, larga en forma de quilla; la hembra es más pequeña de color café oscuro, pecho más claro, los ojos son blancos o amarillos en ambos sexos; pico largo y fuerte (Sada *et al.*, 1995; Allen, 2000).

La voz del zanate se caracteriza por sonidos vocales compuesto por varias notas discordantes y rápidas; incluyendo un ki, ki, ki, ki, ki o kik, kik, kik, kik, kik o bien un sonido más grave chec, chec o un ma-rii ascendente (Sada *et al.*, 1995).

El nido de estas aves tiene forma de copa, construido de pasto en la parte alta de un árbol o arbusto; pone de 2 a 4 huevos de color gris pardo a blanco azulado con manchas color vino, garabatos y puntos negros (Howell y Webb, citados por SEMARNAT y CONABIO, 1997).



FIGURA 7. Zanate macho (*Quiscalus mexicanus*).

Fuente: http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Quiscalus_mexicanus.html

Estas aves se distribuyen desde el suroeste de Estados Unidos hasta el norte de Perú; se puede localizar en la República Mexicana, excepto en Baja California, desde el nivel del mar hasta 2,750 metros de altura (SEMARNAT y CONABIO, 1997).

Como hábitat prefiere la vegetación secundaria, arbustiva, densa, campos de cultivo, granjas, pueblos, parques ciudadanos y manglares (Pettersen y Chalif, citados por SEMARNAT y CONABIO, 1997). Tiene distribución territorial mucho más amplia, para este estudio las aves experimentales se colectaron en el estado de Chiapas en el municipio de Chiapa de Corzo.

El estado de Chiapas, está ubicado en el sureste mexicano integrado por 118 municipios. El municipio de Chiapa de Corzo se ubica en los límites de la depresión central y del altiplano central, con coordenadas geográficas de 16° 42' Norte y 93° 00' Oeste; una altitud de 406 metros sobre el nivel del mar. Limita al norte con los municipios de Soyaló y Osumacinta, al oeste con Tuxtla Gutiérrez, Suchiapa y Villaflores, al Este, con Zinacantán, Ixtapa y Ácala; al Sur con Villa Corzo.

La extensión territorial municipal es de 906.7 km², representa el 7.1% del territorio de la región Centro y el 1.2% de la superficie estatal. La población municipal ascendió a 60,620 habitantes en el año 2000 (INEGI, 2004).

El clima predominante es cálido sub-húmedo con lluvias en verano, en la cabecera municipal la temperatura media anual es de 26°C con una precipitación pluvial de 990 milímetros anuales.

Los principales ríos de este municipio son el Grande de Chiapa o Grijalva y su afluente Santo Domingo; así como el Chiquito, Macular, Nandaburé y Nandalumí.

El territorio municipal está constituido por lomeríos que alternan con terrenos planos situados en los márgenes de los ríos, el noroeste del municipio es la transición de la depresión central del altiplano.

Respecto a las características fisiográficas, se constituye geológicamente por terrenos terciarios, con suelo tipo vertisoles, regosoles y cambisoles; el uso es principalmente agrícola y pecuario, correspondiendo el 23% del territorio a terrenos ejidales y el resto a propiedad privada y terrenos nacionales.

La vegetación es de selva baja y de bosque de encino-pino en el norte del municipio, se compone de una gran variedad de especies, entre ellas cepillo, cupapé, guaje, huisache y mezquite.

La fauna esta formada por una gran variedad de especies, entre las que destacan: cocodrilo de río, coral de cañutos, heloderma, iguana de roca, iguana de ribera, tlacuache y zorrillo, además de una amplia variedad de aves.

El zanate mexicano usa su fuerte pico afilado para atrapar insectos, lagartijas, pequeños vertebrados acuáticos (peces), huevos, se alimenta también de larvas en la tierra, granos, frutos así como de pequeñas crías de otras aves y tiene la capacidad de abrir semillas para alimentarse. También se sabe que se alimentan de ectoparásitos del ganado; los polluelos machos al parecer requieren de mayor cantidad de alimento que las hembras (Ehrlich *et al.*, 1988; Sada *et al.*, 1995; Sibley, 2001).

En primavera los machos establecen pequeños territorios y comienzan el proceso de atraer a las hembras. Varias hembras jerarquizan en el territorio de un

macho. Excluyen a los primeros machos de las crías en el primer año, pero no a las hembras. El cortejo de apareamiento se efectúa con un revoloteo de alas hacia los lados, el macho las sacude de manera exagerada, produciendo un distintivo sonido. La hembra puede responder inclinándose agitando las alas mientras que la cola se amartilla, emitiendo también un sonido en respuesta.

No existe una determinada temporada de crías; éstas permanecen inmóviles con los ojos cerrados y con necesidad de ser alimentados por los padres, los machos no participan en esta tarea.

Una bandada de zanates vivió hasta 12.5 años (USGS, 2002), estas aves prefieren estar posadas y forrajear en grandes grupos, particularmente en épocas donde no hay crías; en invierno el forrajeo lo realizan en grupos sencillos de un sólo sexo.

Gorrión Doméstico (*Passer domesticus*)

Esta ave es conocida como chillón (Guanajuato), gorrión inglés, gorrión europeo (Chiapas), gorrión pecho negro, carrancista y pardal (Sada *et al.*, 1995; Birkenstein y Tomilson, citados por SEMARNAT y CONABIO, 1997).

Pertenece al Orden Passeriformes y a la Familia Passeridae. El macho tiene la corona gris con una raya café amarilla arriba del ojo, babero negro, mejillas blancas y la nuca rojiza en época de reproducción, el resto del tiempo el colorido es menos intenso; el dorso es café opaco con líneas blancas y de un tono café más oscuro, vientre blanquecino. Las hembras y los jóvenes no tienen babero negro, la parte superior de la cabeza es pardusca y el vientre es más claro que en el adulto, tienen un pico grueso y negro en el macho y pardo, amarillo claro en la hembra (Pettersen y Chalif, 1989; Howell y Webb, citados por SEMARNAT y CONABIO, 1997)

Es un ave pequeña de 14.5 a 15.5 cm. Su voz es un chirrido variado y agudo chip o chisis (Sada *et al.*, 1995).

Anida en cavidades naturales o artificiales, en ramas u horquillas de los árboles. (Ehrlich *et al.*, citado por SEMARNAT y CONABIO, 1997)



FIGURA 7. Gorrión macho (*Passer domesticus*).

Fuente: <http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Passer-domesticus.html>

Se encuentra prácticamente en todos los jardines y parques de América del Norte, llega hasta Chiapas y parte de Guatemala. Es nativo de Eurasia y el norte de África, su distribución continúa en constante dinámica.

El hábitat preferido de *Passer domesticus* son las ciudades, pueblos limítrofes con los bosques y tierras de cultivo.

Debido a las limitaciones derivadas de la difícil captura del gorrión, cuya distribución es amplia en el país, para fines de este proyecto se planeó colectarlos en los sitios más favorables por la abundancia de la especie. Una de estas áreas es el Estado de México.

El Estado de México se localiza en la zona central de la República Mexicana, en la parte oriental de la mesa de Anáhuac que se ubica entre los paralelos 18°21'17' de latitud Norte y 98°36' y 100°36' de longitud Oeste, a una altura de 2,683 metros sobre el nivel del mar, en su planicie más alta que es el valle de Toluca.

Colinda al norte con Querétaro e Hidalgo; al sur con Guerrero y Morelos; al Este con Puebla y Tlaxcala; y al Oeste con Guerrero, Michoacán y con el Distrito Federal, al que rodea al norte, este y oeste.

Tiene una extensión territorial de 22, 499.95 kilómetros², cifra que representa el 1.09 % del total del país y ocupa el lugar 25 en extensión territorial, respecto a los demás estados.

Se han identificado climas templados que ocupan la mayor parte del estado, dentro de los altiplanos que forman los valles de Toluca, Lerma y

Cuatlilán-Texcoco, en las partes centro y este del estado, con una temperatura media anual que oscila entre 12° y 18° C y una precipitación pluvial mayor a los 700 milímetros cúbicos; ocupa el 68% de la superficie estatal.

El clima semi-frío se distribuye en el Centro y Este, con una temperatura media anual menor de 16° C y una precipitación promedio anual de 800 milímetros; el clima frío se localiza en los límites con los estados de Tlaxcala e Hidalgo y registra una temperatura media anual inferior a los 18° C y una precipitación anual entre 500 y 700 milímetros. Mientras que el clima frío se localiza en las cumbres altas del nevado de Toluca, Popocatepetl e Iztaccihuatl por debajo de los 0°C.

La precipitación promedio anual fluctúa entre los 1,000 y 1,400 milímetros.

El valle de Toluca está comprendido en tres grandes cuencas: Lerma, ocupa el 27.3% de la superficie estatal; la del río Balsas 37.2% y la del Pánuco 35.5%.

La orografía es muy variada, hay grandes planicies y cuatro grandes sistemas montañosos. La sierra Nevada tiene una altura máxima de 5,452 metros y es el límite con el estado de Puebla. Comprende los volcanes Popocatepetl (5,452 metros) e Iztaccihuatl (5,286 metros); sierra de Patlachique, serranía de Jultepec, Cuautzingo y Ajusco; cerros El Papayo (3,500 metros), El Telarón (3,830 metros), Tláloc (3,900 metros) y Cerro Gordo (3,046 metros). Las sierras de Monte Alto y Monte Bajo son los límites occidentales con el Distrito Federal, comprende el cerro de la Bufa, Monte de Las Cruces, y llega a Ixtapan de la Sal, Atizapán de Zaragoza y Lerma.

El suelo está compuesto de rocas de origen metamórfico: fundamentalmente de gneises y esquistos; sedimentario: representado por pizarras arcillosas del precretácico, margas, areniscas y calizas e ígneas: andesitas y basaltos.

La flora y fauna del estado contiene gran diversidad de biomasa que van desde vegetación de zonas áridas hasta los páramos de alta montaña. La entidad cuenta con 609,000 hectáreas arboladas; 560,000 de bosque de clima templado y frío y 49,000 de matorral, chaparral y selva baja caducifolia. La conjunción de la

región Neoártica al norte y la neotropical al sur son áreas propicias para la diversidad de fauna, entre la cual sobresalen los grupos de mamíferos, aves, reptiles y anfibios.

Passer come varias clases de semilla complementadas con insectos. Los sujetos que se encuentran en el área rural tienden a alimentarse con semillas de campo y las que se encuentran en el estiércol animal; mientras que los urbanos comen otra clase de semilla y hierbas. Un estudio del contenido gástrico de gorriones ha demostrado que en 60% consiste en alimento de ganado (semillas de trigo, maíz, avena, etc.), cereales en un 18%, 17% de semillas de mala hierba y 4% de insectos.

El gorrión doméstico es una especie muy común y prácticamente conocida por todos los habitantes del país, por su nombre "doméstico" implica que esta siempre asociada con el ser humano.

Se aparea de forma monógama, construye su nido entre febrero y mayo, lo hace con plumas, hojas, y papeles en grietas, construcciones, árboles de hojas caducas y coníferas.

Las nidadas tienen entre uno y ocho huevos, con posibilidad de que cuatro resulten con éxito. La incubación inicia una vez que se pusieron todos los huevos, tanto la hembra como el macho incuban por espacios cortos de algunos minutos cada uno. Ésta se lleva a cabo entre 10 y 14 días, una vez que los polluelos nacen tanto el macho como la hembra los alimentan a través de regurgitación.

Existe la evidencia de un gorrión salvaje que vivió cerca de 13 años y 4 meses; sin embargo en vida silvestre viven solamente algunos años.

Forrajean para alimentarse en el suelo, su vuelo es directo con las alas extendidas. Protegen agresivamente su pequeño territorio alrededor del nido; se conoce de 70 especies que han sido atacadas por los gorriones protegiendo sus nidos, estos ataques son intrasexuales, los machos atacan a los de su mismo género y las hembras a las hembras. Utilizan un sistema de posturas y comportamiento para comunicarse con otros individuos de su especie, así como vocalizaciones características para atraer a otros o bien disuadir a extraños.

III. ALCANCES Y LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Este trabajo denominado: "Patogenicidad de dos cepas aisladas en México del virus del Oeste del Nilo, en Avifauna silvestre: *Quiscalus mexicanus* y *Passer domesticus*" corresponde a un subproyecto de tesis, y es parte de un proyecto conjunto titulado: "Determinación de la susceptibilidad de aves silvestres del Estado de Chiapas a dos aislados mexicanos del Virus del Oeste del Nilo" actualmente en proceso de experimentación; bajo la conducción y responsabilidad técnica del personal veterinario del Zoológico Miguel Álvarez del Toro, dependiente del Instituto de Historia Natural del Estado de Chiapas.

OBJETIVO GENERAL.

Evaluar los efectos y el proceso de infectividad-patogenicidad de dos cepas aisladas en México, del Virus del Oeste del Nilo (Tabasco TM 171-03 y Tecate, BCM-04), inoculadas en dos especies endémicas del Orden de los Passeriformes de la avifauna de Chiapas: *Quiscalus mexicanus* (Familia Icteridae), el zanate común y *Passer domesticus* (Familia Passeridae), el gorrión domestico). Asimismo, evaluar el probable papel de ambas especies como posibles hospederos amplificadores del VON en los ciclos de transmisión de la enfermedad en México.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

1. Monitorear títulos de viremia, para inferir el posible papel de las especies aviares como amplificadores virales en los ciclos de transmisión del VON en Chiapas con ambas cepas,
2. Establecer las manifestaciones clínicas,
3. Evaluar la susceptibilidad a la infección de las dos especies aviares; a través de la mortalidad principalmente,
4. Analizar el tropismo viral mediante la persistencia de la infección viral en órganos y tejidos,
5. Discurrir y observar la manifestación de anticuerpos neutralizantes,

6. Determinar descargas virales a través de muestras de cavidades oro faríngeo y cloacal.
7. Establecer la posible patogenicidad aviar diferencial de los dos aislados mexicanos. Considerando de manera conjunta los resultados, producto de la infección en ambas especies por cada una de las cepas.

La hipótesis general de trabajo que se propone es que los aislados mexicanos TM 171-03 y BCM-04 del Virus del Oeste del Nilo inoculados experimentalmente en ambas especies aviares desarrollarán manifestaciones patológicas diferenciales en los dos grupos. Debido a los antecedentes de atenuación de la cepa TM 171-03 se espera que la misma tendrá un efecto marginal en las dos especies inoculadas mientras que la cepa BCM-04 por su cercana homologación con la cepa de VON de NY-99 sería altamente patógena en ambas especies.

LIMITACIONES.

Se debe considerar que el número de ejemplares colectados fue reducido, sin embargo no se debe menguar la importancia de los resultados encontrados, ya que no se tiene conocimiento de trabajos previos con estas especies aviares en el Estado de Chiapas ni con las cepas auténticas mexicanas del Virus del Oeste del Nilo.

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

Tipo de estudio

Transmisión experimental. Dos grupos de especies aviares naturales de Chiapas: (*Quiscalus mexicanus*) y (*Passer domesticus*) se inocularon con dos cepas de VON aisladas en México: las cepas Tabasco (TM 171-03) y Tecate (BCM-04) del Virus del Oeste del Nilo, con la finalidad de analizar varios parámetros de susceptibilidad y patogenia de estas aves e inferir posible papel de las mismas como hospederos amplificadores del virus.

Diariamente, durante 28 días, se observaron signos de infección en las aves inoculadas; indicadores como viremias, titulación de anticuerpos neutralizantes y tropismo viral se evaluaron al final del período del experimento.

La fase experimental se realizó en las instalaciones del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología (CENID-INIFAP), ubicado en el Km 15.5 carretera México-Toluca, Palo Alto, México, Distrito Federal. Se utilizaron las casetas de aislamiento, anexas al laboratorio de Epizootiología, bajo las normas de Alta Bioseguridad de tipo 3 (ver apéndice A).

Sujetos experimentales

Se colectaron un total de 23 aves silvestres; 10 *Quiscalus mexicanus* colectados en Chiapa de Corzo, Chiapas y 13 *Passer domesticus* colectados en el Zoológico de Zacango, en el Estado de México, de sexo indistinto, todas las aves estaban clínicamente sanas y fueron serológicamente negativas al virus de la Encefalitis de San Luís y al Virus del Oeste del Nilo antes de los desafíos, de acuerdo a los análisis efectuados en el Center for Disease Control (CDC) de Fort Collins, Colorado, EEUU (ver anexo 1).

Colecta y traslado.

Los *Quiscalus* se colectaron en el área central de la comunidad de Salvador Urbina en el municipio de Chiapa de Corzo, en el estado de Chiapas; con el apoyo de personal del Zoológico Miguel Álvarez del Toro (ZooMAT). Se usaron redes

móviles de niebla que se colocaron y sostuvieron cerca de los árboles donde anidan y pernoctan, este procedimiento se realizó aproximadamente entre las 20:00 y 23:00 horas pm, se esperó hasta las 22:00 horas para mover las ramas de los árboles y atrapar a las aves cuando éstas volaran. Una vez que caían en las redes el personal las colectaba de manera manual. Se transportaron a las instalaciones del ZooMAT, en la ciudad de Tuxtla Gutiérrez, usando bolsas de manta en vehículo terrestre, para su mantenimiento diario en una etapa de adaptación aproximada de 30 días.

Los *Passer* se colectaron en las instalaciones del parque Zoológico de Zacango, ubicado en Toluca, Estado de México, con apoyo del personal técnico de ese zoológico. Se utilizaron redes de niebla en jaulas vacías de los aviarios durante las primeras horas de la mañana para realizar las capturas. En particular se utilizó una jaula completa sin ejemplares aviares, con semillas desperdigadas a lo largo y ancho y con redes de niebla circundándola. Con las redes, una vez que se tenían un grupo numeroso de aves se dejaban caer y se buscaba su captura en los animales inmovilizados de maneras manual.

Mantenimiento, alimentación y traslado

Los *Quiscalus* se mantuvieron en un área de aislamiento, de 8 x 4 metros aproximadamente, en las instalaciones del ZooMAT (Tuxtla Gutiérrez, Chiapas).

Diariamente a las 9:00 horas de la mañana se efectuaba limpieza y desinfección del área, utilizando equipo de protección (overol plástico y botas de hule) totalmente desinfectados; la desinfección se realizó asperjando Ambientrol. Asimismo las charolas donde se alimentaban las aves eran lavadas y desinfectadas para colocar alimento nuevamente.

La alimentación consistió en aproximadamente 100 grs. de fruta por ave, las frutas de elección fueron papaya, melón, plátano y en ocasiones manzana; en la misma charola, al lado de la fruta, se les colocó una masa de alimento concentrado para ponedoras, preparada con agua; así como agua *ad libitum*.

Este procedimiento se realizó durante 30 días, mientras que las aves se ambientaban al manejo diario; en este período se pesó a cada una de ellas; el

rango de peso fue de 100 a 120 gr; se desparasitaron con piperazina y pamoato de pirantel y se tomaron muestras de sangre de la yugular (aproximadamente 0.2 ml) e hisopos cloacales de cada una para descartar presencia de VON, Virus de la Encefalitis de San Luis, Influenza, Newcastle y/o Salmonella.

Transcurrido este tiempo las aves se trasladaron a las instalaciones del CENID-INIFAP en Palo Alto en Cuajimalpa, Distrito Federal, vía aérea (de acuerdo con el permiso. (ver anexo 2).

Simultáneamente, los *Passer* se mantuvieron en las instalaciones del parque zoológico de Zacango dentro de jaulas de madera y alambre de 3 x 2 metros aproximadamente; durante un tiempo de adaptación de 30 días, eran alimentados diariamente con alimento para aves ponedoras y agua *ad libitum*, y se realizaba la limpieza diaria, posteriormente fueron trasladados a las instalaciones del CENID-INIFAP a la ciudad de México para iniciar el experimento, vía terrestre.

Durante la fase de experimentación, posterior al manejo; diariamente las aves eran alimentadas con papaya, melón y plátano en trozos pequeños, alimento en masa para aves ponedoras (en el caso de los zanates y seco para los gorriones) y agua *ad libitum*. Al mismo tiempo se efectuaba la limpieza de las jaulas, bebederos y comederos.

Cepas utilizadas

Se utilizaron cepas mexicanas del Virus del Oeste del Nilo procedentes de dos aislados de *Corvus corax* (Familia Corvidae: cuervo grande). El primer aislado en el sureste de la República Mexicana, cerca de Villahermosa, Tabasco (cepa TM 171-03) (Tabasco, Villahermosa, cepa TM-17103, código de acceso del Banco Internacional del Genoma AY 660002) y el segundo procedente del estado de Baja California Norte (cepa BCM-04) (Tecate, Baja California Norte, cepa Cc, código de acceso del Banco Internacional del Genoma DQ 080060). Ambos inóculos, con sus respectivos títulos de 10^4 , fueron preparados y proporcionados por el laboratorio de la Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y Otras Enfermedades Exóticas de los Animales, México (CPA).

Fase experimental

Se realizó en las casetas de aislamiento del laboratorio de Epizootiología del CENID-INIFAP en Palo Alto, Distrito Federal; delegación Cuajimalpa. Se integraron dos grupos experimentales colocando los individuos en jaulas para aves de corral dentro de casetas diferentes; el experimento duró 28 días. El manejo se efectuaba con horario de 10 a 12 horas am aproximadamente; se consideró día 0 al de la inoculación. Durante siete días sucesivos se tomaron muestras de sangre, hisopos nasofaríngeos y cloacales. A los catorce días se re inoculó, de manera cruzada, al grupo infundido con la cepa Tecate, infectando a las aves con la cepa Tabasco, para confirmar la presencia de anticuerpos neutralizantes. Diariamente se pesaron y alimentaron aves y limpiaron casetas (ver anexo 3).

El Grupo A se conformó con seis *Passer domesticus* y cinco *Quiscalus mexicanus* en diferentes jaulas, estas aves fueron infectadas con la cepa Tabasco (TM171-03), considerando a un individuo como centinela.

El Grupo B se integró de igual forma con siete *Passer domesticus* y cinco *Quiscalus mexicanus* en diferentes jaulas, estas aves fueron infectadas con la cepa Tecate (BMC-04), manteniendo a un individuo como centinela.

Se identificaron las aves de ambos grupos colocando bandas plásticas de diferentes colores en sus patas, con números consecutivos a cada especie. Se utilizó un formato donde se registró diariamente el peso y el muestreo en sangre.

Inoculación y observación

En el día cero se inocularon las aves del grupo A en el área izquierda de la pechuga, vía subcutánea con una dosis de 10^4 , lo que representa 0.1 ml de la cepa Tabasco (TM 171-03) conteniendo 10,000 UFP y al grupo B con la cepa Tecate (BCM-04), conteniendo igualmente 10,000 UFP; previo a la inyección se limpió el área de inoculación con torundas alcoholadas. Se utilizaron jeringas desechables para insulina (1 cc/mL 29 G x 13 mm).

La dosis de 10^4 del inóculo aplicado emula la dosis viral que inyecta un mosquito vector, infectante, al picar al hospedero potencial.

Los individuos en ambos grupos fueron observados diariamente durante el desarrollo del experimento, registrando en los formatos prediseñados los signos clínicos observados. Conviene mencionar que no se registran datos de constantes vitales para evitar que la excesiva manipulación causara estrés.

Colecta de muestras serológicas

Se colectaron diariamente, en crio-tubos previamente identificados, 0.1 ml y 0.2 ml de sangre de la vena yugular de los gorriones y zanates, respectivamente – que representa aproximadamente el 10 % del peso normal de las aves- durante 7 días post-inoculación. Simultáneamente se tomaron muestras de hisopos nasofaríngeos y cloacales, para analizar descargas virales a través de estas vías.

A las aves muertas durante el experimento, como resultado de la infección, se realizó la necropsia y colectó muestras de tejidos para su análisis.

Procesamiento de las muestras serológicas

Diariamente, tras colectar las muestras serológicas, se centrifugaron (Eppendorf Centrifuge 5410) durante 3 minutos. Después, en una campana de flujo laminar, dentro de área estéril; se separaban los sueros del paquete sanguíneo con micro pipetas y puntas con filtros, para finalmente verterlos en micro tubos previamente identificados y mantenerlos en refrigeración (refrigerador horizontal Scien Temp) a -70°C ; hasta su procesamiento. Las muestras de hisopos, en criotubos, se conservaron de igual forma. Las muestras se enviaron para ser analizadas por personal especializado en los laboratorios del Center for Disease Control (CDC) de Fort Collins, Colorado, USA (ver anexo 1)

Re-inoculación

Para analizar la presencia de anticuerpos neutralizantes, en el día 14 las aves del grupo B (zanates y gorriones) que no murieron durante la primera inoculación, fueron sangradas e inoculadas con una segunda dosis. Este grupo infectado inicialmente con la cepa Tecate fue inoculado con la cepa Tabasco, a razón de 0.1 ml. conteniendo 1700 PFU. Este grupo fue muestreado

serológicamente los días 14, 15 y 16 postinoculación, así como el día 28, día que fueron sacrificados los sujetos sobrevivientes.

Necropsias

Al día 28, las aves que sobrevivieron de ambos grupos se sacrificaron y realizó la necropsia, en el área correspondiente para necropsias en el CENID-INIFAP. El sacrificio fue siguiendo los lineamientos del comité de bioética del INIFAP. Durante la necropsia se tomaron muestras de tejidos de cerebro, corazón, bazo, pulmones, hígado, riñón, páncreas, intestino piel, dentro de criotubos; se mantuvieron en congelación para posteriormente ser enviadas al CDC.

Procesamiento de las muestras colectadas

Técnicas de Laboratorio

Las muestras de sangre y tejidos, fueron procesados en el laboratorio del CDC, en Fort Collins Colorado USA para aislamiento viral con la técnica de Ensayo de Placas; colectando el sobrenadante de los sueros colectados y se inocularon placas de 6 pozos con células Vero, con cada una de las muestras, haciendo titulación por duplicado.

Para conocer la respuesta inmune humoral a la infección experimental por las cepas de VON, las muestras de suero fueron analizadas mediante la prueba de Neutralización por Reducción de Placa (PRNT) (ver apéndice B).

Análisis de resultados

Se elaboró una base de datos en Excel con los resultados obtenidos de las viremias a través de la titulación de virus en sueros, tejidos e hisopos nasofaríngeos y cloacales. También se calcularon medidas estadísticas y se analizaron como variables dependientes.

Acorde al tamaño de muestra, el análisis estadístico se desarrolló aplicando pruebas t de Student de una sola cola para probar las hipótesis de trabajo. Se aplicó t de Student como corresponde a muestras pequeñas; entendiendo que la hipótesis de nulidad niega la existencia de diferencias en los promedios y la t

calculada será menor o igual a la t teórica. Para probar las hipótesis de trabajo se aplico la siguiente fórmula:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sigma \sqrt{1/n_1 + 1/n_2}}$$

donde

$$\sigma = \sqrt{\frac{n_1 s_1^2 + n_2 s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

Donde:

t = valor calculado de t

H_0 = Hipótesis de Nulidad

H_1 = Hipótesis Alterna

\bar{X}_1 = Promedio 1

\bar{X}_2 = Promedio 2

σ^2 = Varianza poblacional

n_1 = Muestra 1

n_2 = Muestra 2

S^2_2 = Varianza Muestral

Las pruebas de hipótesis estadística, para determinar diferencias significativas entre las variables, de una sola cola (Spiegel *et al*, 2005) se establecieron con los siguientes parámetros:

Con 95% de nivel de confianza, 5 y 3 grados de libertad respectivamente (determinados por el tamaño de la muestra: 6 en el caso de *Passer* y 4 para *Quiscalus*) el valor teórico de t corresponde a 2.02 para *Passer* y 2.35 para *Quiscalus* por lo cual, si el valor calculado de t es superior al teórico acepto la hipótesis de trabajo; si por el contrario, el valor calculado de t es inferior o igual al valor teórico del estadístico acepto la hipótesis de nulidad.

Considerando como hipótesis de trabajo el que la patogenicidad de ambas cepas sea diferenciada; esperando que la cepa Tecate en ambas especies aviares sea más agresiva.

Para completar y fortalecer la interpretación de los datos se utilizó el paquete SPSS para Windows v.13 para el Análisis de Varianza, que permitió comparar la patogenicidad de las cepas en las dos especies aviares, aplicando el modelo siguiente:

$$Y_{ij} = \mu_0 + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta_{ij}) + e_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Respuesta obtenida al tratar dos especies aviares

i = Especies aviares

j = Cepas utilizadas del agente etiológico (Virus del Oeste del Nilo)

μ_0 = Suma de las medias

α_i = Efecto de la especie

β_j = Efecto de cada cepa en cada especie

$\alpha\beta_{ij}$ = Producto del efecto de cepa por especie

e_{ij} = Errores particulares

Considerando a Y como la respuesta obtenida al tratar dos especies aviares con dos cepas de un virus determinado, es el resultado de la suma de las medias más el efecto de la especie más el efecto de cada cepa en la especie, más los errores particulares.

La duración de la viremia en el grupo de gorriones inoculados con la cepa BCM-04 (Tecate) fue prácticamente de siete días en dos de los cuatro sujetos que se mantuvieron vivos durante todo el experimento, observando viremias entre 2.7 y 10 log₁₀ UFP/ml en el día 4_{pi}. Con un pico de viremia promedio de 9.5 log₁₀ UFP/ml.

Los títulos máximos de 9.5 y 10.1 log₁₀ UFP /ml se detectaron al día 3_{pi} en los gorriones que murieron debido a la infección. No obstante, el grupo de las seis aves no mostró signos clínicos de haber sido afectado por la cepa. Esta viremia se mantuvo en un rango de entre 2.3-10.1 log₁₀ UFP/ml (ver cuadro 2).

Cuadro 2. Viremia de gorriones inoculados con cepa Tecate, por día.

| INDIVIDUO | Días postinoculación (log ₁₀ UFP/mL) | | | | | | |
|------------|---|-----|------|-----|--------|--------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Gorrión 8 | 6 | 9 | 10.1 | 10 | muerto | | |
| Gorrión 9 | 4.5 | 5.6 | 5.9 | 4.9 | 3.2 | 2.3 | 2.7 |
| Gorrión 10 | 6.4 | 6.4 | 4.8 | 2.7 | <1.7 | 1.7 | 1.7 |
| Gorrión 11 | 5.2 | 7.1 | 5.7 | ND | 4 | <1.7 | <1.7 |
| Gorrión 12 | 5.8 | 7.6 | 7.6 | ND | 4.5 | 3.4 | <1.7 |
| Gorrión 13 | 5 | 8.6 | 9.5 | 9.4 | 6.5 | muerto | |
| PROMEDIO | 5.9 | 8.4 | 9.4 | 9.5 | 5.8 | 2.8 | 2.1 |

En el grupo de zanates inoculados con la cepa Tabasco, todos los individuos mantuvieron viremias detectables, salvo el control. Los títulos de viremia en promedio están en un rango de 2.5 a 10.2 log₁₀ UFP /ml. El máximo título de viremia (10.2 log₁₀ UFP /ml) se mantuvo elevado durante los días 4 y 5_{pi} conservando para el día seis, títulos de 8.5 log₁₀ UFP /ml; esta ave murió el día 7_{pi}. La mortalidad se presentó desde el tercer día _{pi}. en un sujeto de este grupo, alcanzando un pico de viremia promedio de 9.6 log₁₀ UFP /ml (ver cuadro 3) el día 03.

Cuadro 3. Viremia de zanates inoculados con cepa Tabasco, por día.

| INDIVIDUO | Días postinoculación (log ₁₀ UFP/mL) | | | | | | |
|------------------|---|------|------|--------|------|--------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Zanate 1 | 5.5 | 9.2 | 8.2 | Muerto | | | |
| Zanate 2 | 4.1 | 6.5 | 8.2 | 7.6 | 6.8 | 4.2 | 2.5 |
| Zanate 3 | 5 | 8.6 | 10 | 10 | 5.8 | Muerto | |
| Zanate 4 | 4.3 | 8.1 | 9.7 | 10.2 | 10.2 | 8.5 | Muerto |
| Zanate 5 CONTROL | <1.7 | <1.7 | <1.7 | <1.7 | <1.7 | <1.7 | <1.7 |
| PROMEDIO | 5.0 | 8.7 | 9.6 | 9.9 | 9.7 | 8.2 | NR |

En el grupo de los zanates que fueron infectados con la cepa Tecate se detectaron viremias durante los siete días p_i . Mostraron títulos que oscilan entre 2.2 y 10.3 log₁₀ UFP /ml, estos valores que se consideran elevados, se mantuvieron estables mientras duró el experimento. El pico máximo de viremia en este grupo fue de 9.3 log₁₀ UFP/ml como promedio.

El grupo en general, manifestó signos de enfermedad tales como plumaje erizado y letargo, no obstante las aves seguían alimentándose y consumiendo agua regularmente como se había previsto. Aún cuando los títulos de viremia se mostraron elevados únicamente un ave murió el día 4 p_i . (ver cuadro 4).

Tabla 4. Viremia de zanates inoculados con cepa Tecate, por día.

| INDIVIDUO | Días postinoculación (log ₁₀ UFP/mL) | | | | | | |
|----------------|---|------|------|------|--------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| Zanate 7 | 4.2 | 6.1 | 7.7 | 7.9 | 7.1 | 6.8 | 6.3 |
| Zanate 8 | 4.8 | 6.2 | 7 | 5.2 | 2.2 | 2.7 | <1.7 |
| Zanate 9 | 5.4 | 8.3 | 9.6 | 10.3 | Muerto | | |
| Zanate 10 | 4.9 | 6.3 | 6.5 | 4.4 | 4.7 | 1.7 | <1.7 |
| Zanate CONTROL | <1.7 | <1.7 | <1.7 | <1.7 | <1.7 | <1.7 | <1.7 |
| PROMEDIO | 5.0 | 7.7 | 9.0 | 9.7 | 6.6 | 6.3 | 5.8 |

Los perfiles de viremia producto de la inoculación experimental con cepas mexicanas de Virus del Oeste del Nilo encontrados en las dos especies aviares chiapanecas reflejan que ambas especies funcionan de manera eficiente como hospederos amplificadores del virus.

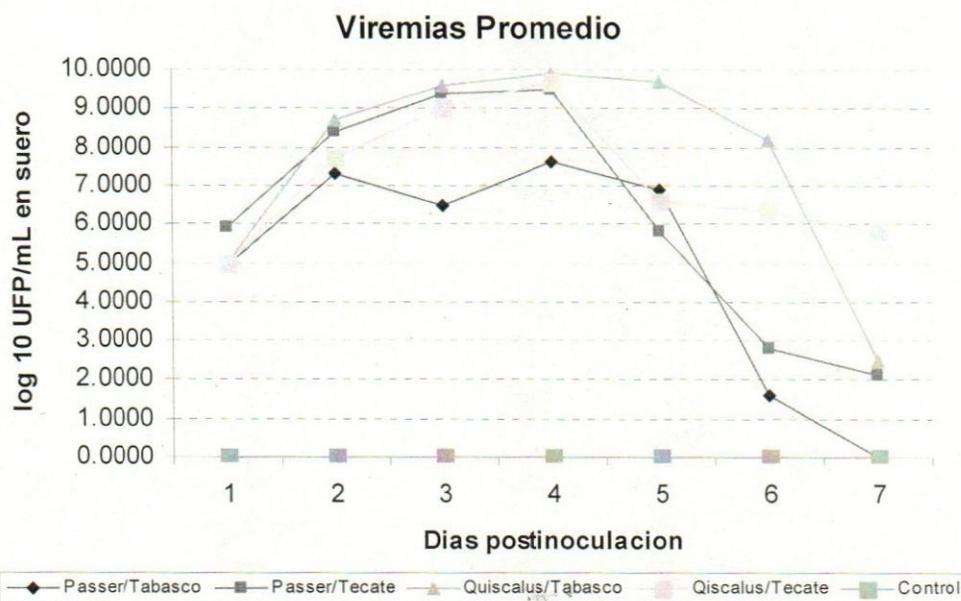


Gráfico 1. Perfiles de Viremias producidas experimentalmente por cepas mexicanas del Virus del Oeste del Nilo. Se observa que los promedios más elevados se presentan en la especie *Quiscalus mexicanus* inoculada con la cepa Tabasco (TM 171-03).

Observación de manifestaciones clínicas.

A pesar de la viremia elevada el grupo de gorriones inoculados con la cepa Tabasco, conservó un estado físico regular; sin presentar manifestación o signo visible compatible con la enfermedad; excepto dos ejemplares que mostraron poca actividad y depresión; uno de estos ejemplares mostró descenso en el peso corporal, iniciando el experimento con 32 gr y muriendo el día 5_{pi} con 19 gr., sin embargo continuaban todos alimentándose y consumiendo agua de manera regular. El registro en los pesos corporales del grupo no muestra cambios significativos.

A diferencia de los gorriones, en el grupo de zanates inoculados con la misma cepa se observaron signos clásicos de la infección como son plumaje erizado, decaimiento y anorexia. Observando como consecuencia un descenso considerable en el peso corporal (ver anexo 3).

Mientras tanto; el grupo de zanates inoculados con Tecate, en general manifestó signos de enfermedad tales como plumaje erizado, decaimiento, torticolis y letargo, no obstante las aves seguían alimentándose y consumiendo agua regularmente, conservando el grupo de zanates el peso corporal con el que

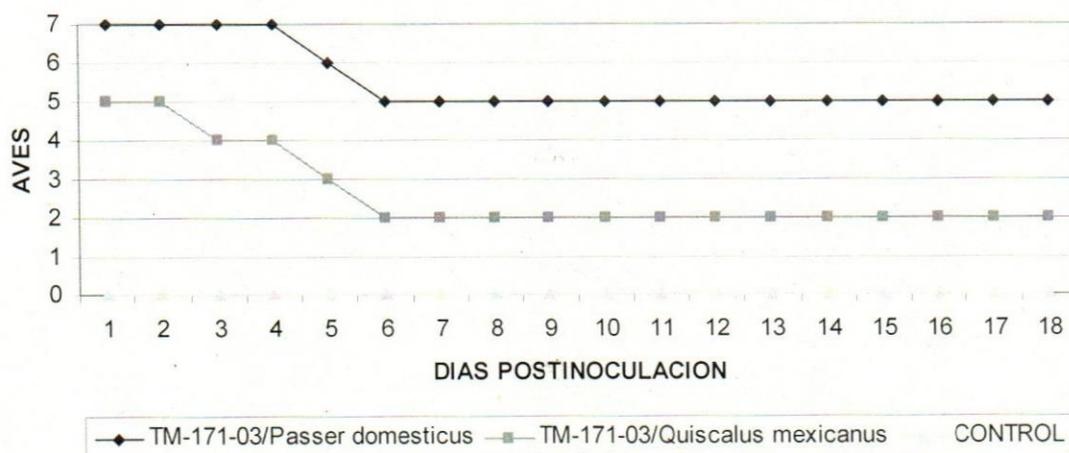
iniciaron el experimento. Aún cuando los títulos de viremias se mostraron elevados únicamente murió el día 4_{pi} un ave mostrando signos clásicos neurológicos como cuello torcido hacia el dorso del ave. De manera diferencial el grupo de gorriones inoculados con la cepa Tecate no mostró descenso en el peso corporal.

Morbilidad y mortalidad

Cepa Tabasco

En el grupo de zanates inoculados con la cepa Tabasco, se observó mortalidad desde el día 3_{pi} presentando la mayor frecuencia de mortalidad en el experimento (60%), murieron tres ejemplares del grupo. Por su parte, en el grupo de los gorriones las variables de estudio presentaron otro comportamiento ya que en estas aves la mortalidad se presentó hasta el día 5_{pi} y la mortalidad fue de 28.57%, donde fallecieron solo dos sujetos del grupo (ver gráfico 2).

MORTALIDAD DIFERENCIAL DE LA CEPA TABASCO EN AMBAS ESPECIES AVIARES



en los grupos de *Passer domesticus* (gorrión doméstico) y *Quiscalus mexicanus* (zanates mexicanos) inoculados con la cepa Tabasco; se observa que los gorriones se mantuvieron con mas vida durante la fase de experimentación que los zanates.

Cepa Tecate

En el grupo de gorriones inoculados con la cepa Tecate la mortalidad se presentó hasta el día 4_{pi} con una tasa de 33.33%, con la baja de dos aves. Entre

el grupo de zanates inoculados con esta cepa la mortalidad ocurrió en menor proporción (20%) ya que murió una sola ave hasta el día 5_{pi}, cuando la viremia ya se encontraba en descenso.

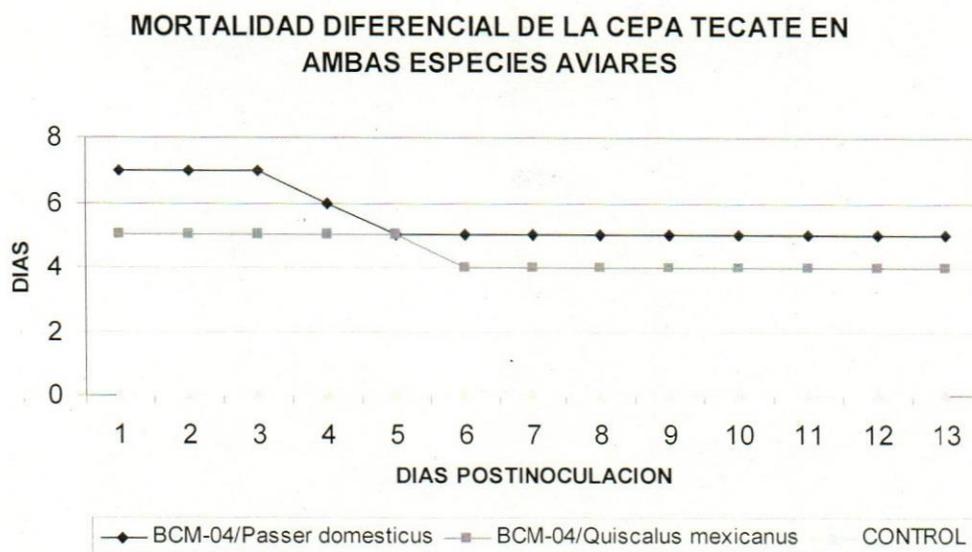


Gráfico 3. Mortalidad en los grupos de *Passer domesticus* (gorrión doméstico) y *Quiscalus mexicanus* (zanates mexicanos) inoculados con la cepa Tecate; se observa mayor mortalidad en los gorriones durante la fase de experimentación que en los zanates.

En conclusión, la supervivencia presenta mayor proporción en la especie de los gorriones infectados con la cepa Tabasco, mientras que en los zanates inoculados con la cepa Tabasco la sobrevivencia es más baja (ver gráfico 2).

Grupo Gorriones.

Entre los gorriones inoculados con la cepa Tabasco que murieron durante el experimento en los primeros 5_{pi} días, la viremia se mantuvo elevada; variando entre 4.85 y 7.35 log₁₀ UFP/ml, aunque en estos días se presentó un ligero descenso en los niveles de virus detectados en los sueros.

Esta observación contrasta con lo ocurrido en los gorriones que murieron antes de terminar la fase experimental y que fueron infectados con la cepa Tecate, en ellos los títulos de viremia mostraron elevación hasta el día 5_{pi}.

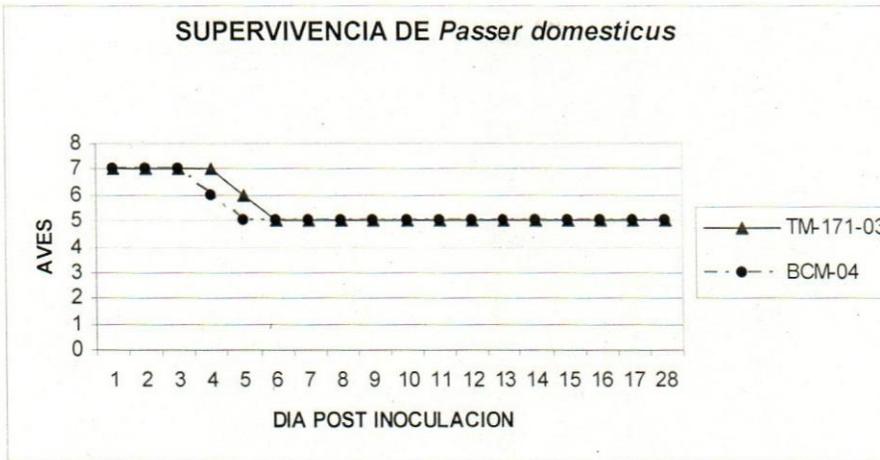


Gráfico 4. Supervivencia en los dos grupos de la especie *Passer domesticus* (gorrión doméstico) inoculadas; se observa que los gorriones inoculados con la cepa Tabasco se mantuvieron más tiempo con vida durante la fase de experimentación que las inoculadas con la cepa Tecate.

Grupo Zanates.

En cuanto a los zanates que murieron en el experimento, infectados con la cepa Tabasco, los niveles de viremia se registraron en ascenso hasta el día 4_{pi} manteniendo altos niveles de virus hasta el día de la muerte de estos individuos. Los títulos de viremia se registraron dentro de un rango de 4.93 a 10.10 log₁₀ UFP/ml. En el grupo de los 5 zanates que se infectaron con la cepa Tecate solamente murió un ejemplar que durante 4_{pi} días sostuvo niveles elevados de viremia hasta el día que murió.

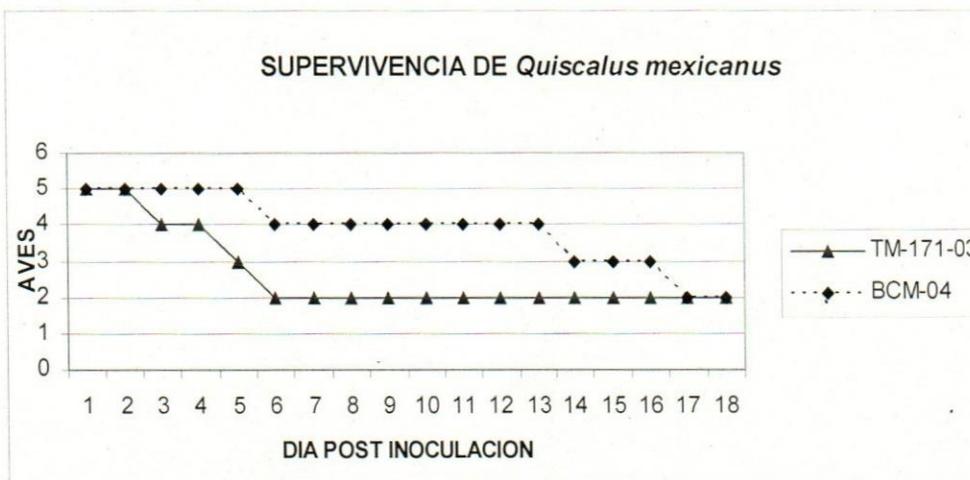


Gráfico 5. Supervivencia de *Quiscalus mexicanus*. Nótese que la especie resulta más resistente a la inoculación con cepa Tecate, mientras que la mortalidad es mayor entre los inoculados con cepa Tabasco.

Hallazgos de necropsia

Los hallazgos anatomopatológicos observados de manera general en la necropsia fueron:

a) **Esplenomegalia** de ligera a severa, específicamente tres aves (50%) de los gorriones inoculados con la cepa Tabasco y cuatro (66%) infectadas con la cepa Tecate presentaron este hallazgo mientras que en dos zanates inoculados con Tabasco y dos infectados con la cepa Tecate mostraron esta misma lesión.

b) **Congestión esplénica** en once de los sujetos de estudio,

c) **Agrandamiento en páncreas** en 6 de los 23 individuos;

d) **Engrosamiento de la pared de la mucosa intestinal** en nueve de las aves.

e) **Congestión ligera en riñón** en cuatro de las aves y

f) **Venocongestión cerebral y meninges engrosadas** en tres casos (ver cuadro 5).

Cuadro 5. Hallazgos de necropsia por especie y cepa.

| ESPECIE | CEPA | Hallazgo en la necropsia | | | | |
|---------------------------------------|---------|--------------------------|---------------------------|------------------------------------|---------------------|----------------------------|
| | | Esplenomegalia | Agrandamiento de páncreas | Engrosamiento de mucosa intestinal | Congestión en riñón | Venocongestión en encéfalo |
| Gorrion (<i>Passer domesticus</i>) | Tabasco | 3 | 3 | 2 | 1 | 2 |
| | Tecate | 4 | 1 | 3 | 2 | 0 |
| Zanate (<i>Quiscalus mexicanus</i>) | Tabasco | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 |
| | Tecate | 1 | 1 | 3 | 0 | 0 |

Tropismo viral

Analizando los resultados de títulos de virus detectados en las muestras de tejidos a través de la técnica de Ensayo de Placas, en el grupo de gorriones inoculados con la cepa Tabasco se determinó que el tropismo viral se produce hacia riñón, hígado, corazón y pulmón en la mayoría de los casos. Por el contrario, en el grupo de gorriones inoculados con la cepa Tecate en los dos individuos muertos el día 04 y 05_{pi}. se detectaron virus en todos los órganos analizados, (piel,

corazón, páncreas, hígado, bazo, intestino, pulmones, cerebro y riñón) aunque los títulos más elevados de virus se apreciaron en pulmón.

En el grupo de los zanates infectados con la cepa Tabasco, los resultados de tropismo viral muestran que se encontró VON en todos los órganos analizados, excepto páncreas e intestino. En el grupo experimental de zanates infectados con la cepa Tecate se determina tropismo viral hacia todos los órganos analizados (ver cuadro 6).

Cuadro 6. Tropismo viral en tejidos postmortem.

| INDIVIDUO | DÍA DE MUERTE | CEPA | TEJIDO | | | | | | | | |
|------------|---------------|---------|---------|--------|------|-------|----------|------|--------|-----------|---------|
| | | | CORAZÓN | HÍGADO | BAZO | RIÑÓN | PANCREAS | PIEL | PULMÓN | INTESTINO | CEREBRO |
| Gorrión 1 | 28 | Tabasco | <0.7 | <0.7 | <0.7 | 0.7 | <0.7 | <0.7 | <0.7 | <0.7 | <0.7 |
| Gorrión 2 | 28 | Tabasco | <0.7 | <0.7 | <0.7 | 1.3 | <0.7 | <0.7 | 1.9 | <0.7 | <0.7 |
| Gorrión 3 | 28 | Tabasco | <0.7 | <0.7 | <0.7 | 0.7 | <0.7 | <0.7 | <0.7 | <0.7 | <0.7 |
| Gorrión 4 | 6 | Tabasco | 2.9 | 5.7 | ND | 3.6 | <0.7 | 4.9 | 4.5 | <0.7 | 2.4 |
| Gorrión 5 | 5 | Tabasco | 7.7 | 5.2 | 4.8 | 5.9 | <0.7 | ND | 5.2 | ND | 3.1 |
| Gorrión 8 | 4 | Tecate | 7.6 | 8.1 | ND | ND | 4.9 | 7.6 | 9.3 | <0.7 | 8 |
| Gorrión 13 | 5 | Tecate | 7.7 | 8 | 7.6 | 7.2 | 5.2 | 8 | 9.2 | 3.1 | 8.2 |
| Zanate 1 | 3 | Tabasco | 8.1 | 7.9 | 3.8 | 8.6 | <0.7 | ND | 8.5 | ND | ND |
| Zanate 3 | 5 | Tabasco | 7.7 | 7.4 | 6.6 | 7.9 | 4.7 | 7.8 | ND | 2.7 | 8.1 |
| Zanate 4 | 6 | Tabasco | 7.5 | 2.9 | 5.3 | 6.1 | <0.7 | 7 | 9.5 | <0.7 | 6.2 |
| Zanate 7 | 28 | Tecate | 5.1 | 5.8 | 5.5 | 5.9 | 6 | 4.9 | 5.2 | 3 | 3.4 |
| Zanate 9 | 4 | Tecate | 8.2 | 7.6 | 7.5 | 8.8 | 6.7 | 8 | 9.3 | 8.8 | 7.4 |

En los gorriones inoculados con la cepa Tecate se observa tropismo viral elevado en pulmón con títulos máximos de 9.5 UFP. A diferencia de los títulos observados de los sujetos inoculados con Tabasco, donde se observa tropismo viral hacia este mismo órgano, aunque con títulos más bajos, de 1.9 a 5.2 UFP.

Presencia de anticuerpos neutralizantes a la 2ª inoculación en el grupo de zanates y gorriones

Los sueros obtenidos los días 14 y 28_{pi} del grupo de zanates inoculados por segunda vez, se analizaron a través de la técnica de Reducción y Neutralización de placas PRNT con la finalidad de buscar anticuerpos neutralizantes o seroconversión para confirmar la infección y corroborar la respuesta del sistema

inmunológico de las aves. Se encontró un 100 por ciento de neutralización de anticuerpos (ver cuadro 7).

Cuadro 7. Presencia de Anticuerpos Neutralizantes.

| INDIVIDUO | DIA POSTINOCULACION | CEPA | PRNT VON 1:10 AL DÍA 28 |
|---------------------|---------------------|---------|-------------------------|
| <i>Passer</i> 1 | 28 | Tabasco | 100% |
| <i>Passer</i> 3 | 28 | Tabasco | 100% |
| <i>Passer</i> 4 | 6 | Tabasco | 100% |
| <i>Passer</i> 6 | 28 | Tabasco | 100% |
| <i>Passer</i> 10 | 28 | Tecate | 100% |
| <i>Passer</i> 11 | 28 | Tecate | 100% |
| <i>Quiscalus</i> 8 | 28 | Tabasco | 100% |
| <i>Quiscalus</i> 10 | 28 | Tabasco | 100% |

Descargas virales

La descarga viral se determinó por medio de la técnica de Ensayo de Placas en las muestras de hisopos nasofaríngeos y cloacales colectados; en ambos grupos de estudio se detectó la presencia viral; títulos de entre 1.2 y 5.0 \log_{10} UFP/ml de VON en los días 3 y hasta el 5 día p_i , en gorriones inoculados con Tabasco y Tecate; así como títulos de 0.7 y 6.2 \log_{10} UFP/ml en zanates inoculados con Tecate y Tabasco, en el caso de hisopos nasofaríngeos y títulos de 4.6 y 4.9 \log_{10} UFP/ml en los hisopos cloacales en ambas especies infectados con la cepa Tecate.

Determinación estadística de la patogenicidad de las cepas según especie.

Cepa Tecate

Usando los valores promedio de viremia, en los *passer* inoculados con la cepa Tecate comparados con aquellos inoculados con la cepa Tabasco los primeros resultan mayores. El valor calculado de t (3.9; 5.9 y 4.3 en los tres primeros días consecutivamente) es mayor que el valor teórico (2.02) con 5 grados de libertad. Puede afirmarse que la diferencia es estadísticamente significativa y la cepa Tecate es más agresiva en esta especie (ver cuadro 8).

Cepa Tabasco

En la especie *Quiscalus* el promedio de viremia de los individuos inoculados con la cepa Tabasco resultó significativamente mayor que los infectados con cepa Tecate. El valor calculado de t fue 3.7 en los seis días posteriores a la inoculación, superior al valor teórico de t (2.35) con tres grados de libertad (ver cuadro 8).

Cuadro 8. Valores de t de Student calculadas por especie y día.

| Especie | Valor teórico de t | Días postinoculación | | | | | |
|----------------------------|----------------------|----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| <i>Passer domesticus</i> | 2.02 | 3.9 | 5.9 | 4.3 | | | |
| <i>Quiscalus mexicanus</i> | 2.35 | 3.7 | 7.2 | 8.0 | 8.8 | 7.4 | 6.1 |

VI. DISCUSIÓN

Los estudios conducidos y descritos en este documento representan las primeras evaluaciones de cepas mexicanas del VON en potenciales hospederos amplificadores virales aviares de la fauna del nuevo mundo fuera de los Estados Unidos de Norteamérica. Esto adquiere relevancia al considerar los enigmas sobre la ecología y en general el ciclo del Virus del Oeste del Nilo, particularmente en las regiones neotropicales del continente americano.

En la actualidad no existen evidencias científicas que respondan con precisión a grandes y tan variadas interrogantes como: primera, el desconocimiento total de la patogenicidad de las cepas circulantes del VON en territorio mexicano y sus probables hospederos amplificadores; segunda, el impacto severo de la enfermedad en poblaciones humanas de los EEUU, en contraste con el impacto casi nulo de la misma en la población mexicana; y tercera, el grupo o grupos de artrópodos que estarían involucrados en los ciclos virales.

Un aspecto innegable en la actualidad es que el VON circula extensamente en territorio mexicano, incluyendo la región chiapaneca en donde los estudios de seroencuestas en fauna silvestre y doméstica han demostrado claramente la presencia del patógeno en Chiapas (CPA/SAGARPA, 2005; Estrada-Franco *et al.*, información no publicada, 2007).

La relevancia del presente estudio y los datos obtenidos representan el primer esfuerzo científico concertado para dilucidar la complejidad de los ciclos del VON en territorio mexicano y muy probablemente en otras regiones de Latinoamérica, respondiendo, quizás parcialmente, la primera interrogante planteada.

Un aporte medular de este estudio fue probar la hipótesis general de que dos cepas de regiones zoogeográficas diferentes de México (del Neártico-Tecate, Baja California y del Neotrópico-Villahermosa, Tabasco) podrían presentar patologías diferenciales en dos especies aviares que históricamente, en particular en uno, *Passer domesticus* y el otro presuntamente por relación biológica con

esta familia, *Quiscalus mexicanus*, son eficientes hospederos amplificadores del VON. Apoya esta proposición la evidencia de que la cepa de Tabasco (TM-171-03) presenta cuatro mutaciones, dos de ellas en las proteínas estructurales y dos en las no estructurales, que se asociarían, al menos la del gene E, con propiedades atenuantes en modelos murinos (Beasley *et al.*, 2004).

Esta observación podría explicar parcialmente la posible y quizás amplia presencia de este fenotipo extensamente distribuido en el sur de la República Mexicana y que explicaría la no existencia de la enfermedad en los vertebrados superiores en estas regiones. Por otro lado, la posible patología generada por la cepa mexicana de Tecate del VON sería, en este caso, similar al efecto genotípico y fenotípico que se observa en los estudios experimentales con la cepa NY 99 en modelos aviares y que tiene una diferencia de 3 mutaciones con Tecate.

En concreto, se observa que las dos cepas mexicanas generan patologías severas en los modelos estudiados y es posible, inferir que existe mayor virulencia de la cepa Tecate para los gorriones y mayor virulencia de la cepa Tabasco para los zanates. Esta aseveración se realiza con base en la mayor mortalidad por la cepa Tabasco (60%) y mayor prevalencia en la especie de *Quiscalus mexicanus*; en tanto que la tasa mínima de mortalidad de 20% se observó con la infección por la cepa Tecate en *Passer domesticus*. Los datos clínicos observados diariamente apoyan esta diferencia.

En los estudios aquí referenciados la selección de los passeriformes, *Passer domesticus* y *Quiscalus mexicanus* se concibió de acuerdo con información preliminar obtenida en la habilidad reconocida del *Passer* de infectarse con diferentes cepas del VON, incluyendo la NY99 y de un miembro cercano del *Q. mexicanus* de la misma familia icteridae, que se identifica como *Quiscalus quiscula*, estas familias aviares han sido considerados excelentes hospederos amplificadores del virus del Oeste del Nilo particularmente a través de estudios con las cepas aisladas en el nuevo mundo (Komar *et al.*, 2003). Sin embargo la habilidad del *Passer domesticus* como un amplificador competente del VON ya había sido reconocida desde la década de 1950 cuando infecciones experimentales con cepas africanas (Egipto: Ar-248) generaban títulos altos de

hasta 8 log₁₀ UFP/ml de viremia (Work *et al.*, 1955). En general los estudios conducidos recientemente en los EEUU refuerzan la hipótesis de que los passeriformes y charadriformes son los grupos altamente competentes para infectarse con el VON en comparación con otros grupos de aves (Komar *et al.*, 2003).

Los estudios previos realizados por Hayes *et al.*, 2005 revelan que aproximadamente 100% de los mosquitos *Culex tarsalis* se infectan después de consumir sangre con concentraciones de VON de 10⁷ UFP/ml, mientras que solamente 36% se infectan después de consumir 10⁴ UFP/ml.

Las viremias detectadas en este estudio concuerdan claramente con observaciones históricas planteadas. Por ejemplo, *Passer domesticus* infectado con cepa Tecate del VON alcanzó un máximo de viremia de 10^{10.1} UFP/ml mientras que la cepa Tabasco alcanzó viremias máximas de 10^{8.4} UFP/ml. De igual manera la familia *Quiscalus mexicanus* con ambas cepas de Tabasco y Tecate alcanzó valores entre 10^{9.6} y 10^{10.2} UFP/ml estos títulos son aproximados a los resultados reportados por Komar *et al.*, en 2003 con *Quiscalus quiscula* de 10^{11.8} UFP/ml y con Langevin *et al.*, en el 2005. Es de esperarse que la fauna de mosquitos presentes en el territorio mexicano podría potencialmente infectarse en una proporción significativa, particularmente los ornitofílicos del genero *Culex*, en caso de alimentarse de las especies aquí estudiadas e hipotéticamente infectadas con VON.

Experimentos con las cepas Nueva York (NY99), Kenia (KEN) y Australia (KUN ó KUNJIN) en cuervos revelan tasas de mortalidad elevadas y títulos de viremia de hasta 9.2 log₁₀ UFP/ml asociados a la infección por los primeros aislados; no así con la cepa KUN (Langevin *et al.*, 2005), estos datos refuerzan y evidencian la similitud en los títulos de viremia registrados en la presente investigación y su propensión a infectar a la fauna de mosquitos de la familia Culicidae.

En el estudio realizado, se diagnosticó la presencia de 100% de anticuerpos neutralizantes en ambas especies, sin embargo Komar *et al.*, en el año 2001, al experimentar con *Quiscalus quiscula* no detectó anticuerpos neutralizantes. Este

hecho parece indicar que es viable la protección inmunológica a subsecuentes infecciones por diferentes cepas del VON, al menos en estas especies aviares y con estos aislados mexicanas.

Los resultados encontrados en el presente estudio consistentes con los hallazgos en EEUU, permiten observar que tanto *Passer* como *Quiscalus* son altamente susceptibles y pueden funcionar como hospederos amplificadores competentes para las cepas mexicanas del VON. Casi de manera inmediata a la inoculación experimental esta última familia presentó signos clínicos propios de la enfermedad y títulos altos de virus no así *Passer*, donde se observaron viremias elevadas, pero no signos de enfermedad. Esto podría significar que, en el caso de los *Passer*, son especies inmunológicamente muy competentes tanto para amplificar como para resistir al virus.

Tomando como referencia las viremias elevadas en passerinas, se ha demostrado en estudios que en codornices (*Colinus virginianus*), gallinas domésticas (*Gallus gallus*), periquitos australianos (*Melopsittacus undulatus*) y palomas (*Columba livia*), los perfiles de viremias que desarrollan no son eficientes para que puedan infectar vectores como *Culex pipiens* y *Cx. quinquefasciatus* ($10^{5.0}$ UFP/ml). Las columbiformes (palomas) se analizaron directamente de su hábitat; es decir que estaban infectadas de manera natural (Komar *et al.*, 2003; Allison *et al.*, 2004; Langevin *et al.*, 2001).

Diferentes investigadores en EEUU han experimentado con diversas especies aviares, entre ellas las rapaces se ha demostrado que es posible la transmisión oral al consumir aves y/o mamíferos infectados con el virus (Brault *et al.*, 2004); también se presenta la posibilidad de transmisión por contacto directo; usando para ello aves infectadas junto a controles y han observado que es viable la infección en ausencia del vector, (Langevin *et al.*, 2001, Komar *et al.*, 2003; Nemeth *et al.*, 2006). En el presente trabajo aún cuando se manejaron las aves enfermas junto con los controles, y no obstante los títulos elevados de virus en piel este tipo de transmisión no ocurrió. Aunque se debe considerar que el período de exposición fue sólo de 28 días.

Es conveniente mencionar que a diferencia de otros estudios, en donde han sido utilizadas dosis más elevadas, por ejemplo Langevin *et al.*, (2005) utilizaron dosis de 10^8 UFP, –la dosis de inóculo utilizado en esta investigación fue de 10^4 , emulando la picadura de un mosquito vector– considerando 10^3 UFP dosis infectante suficiente (Turell *et al.*, 2000), esto garantiza que los zanates y gorriones son especies susceptibles de enfermarse con una concentración baja de virus.

Entre las manifestaciones clínicas encontradas en las passerinas de nuestro estudio están letargo, postura inusual, plumas erizadas, decaimiento y tortícolis particularmente en *Quiscalus* inoculados con la cepa Tabasco. Es relevante señalar que los sujetos murieron después de 24 horas de aparecidos los signos; de manera semejante a lo descrito por Komar *et al.*, (2003) con urraca azul y gaviota de Delaware. Específicamente un ejemplar de los zanates, inoculado con Tecate, mostró signos de encefalitis (desorientación, tortícolis, convulsión) tal como lo reportan Brault *et al.*, (2004) al experimentar con cuervos americanos (*Corvus brachyrhynchos*).

Con base en los hallazgos en necropsias y títulos de viremia en pulmón (4.5-9.5 UFP) se asume que no todos los daños o lesiones encontrados postmortem se relacionan directamente con la carga viral y su persistencia en los órganos, puesto que en pulmón se observa mayor tropismo viral y en la necropsia no se observaron lesiones. No obstante, en bazo, riñón y cerebro se encontraron títulos considerables de partículas virales que deben relacionarse con los hallazgos patológicos. En estudios efectuados en aves muertas, se encontró una carga viral mayor en riñón, comparada con la de cerebro, corazón y pulmones (Kristen & Kramer, 2001). En nuestro caso esto no se cumple y el pulmón parece ser el órgano más afectado y menos severo en riñones.

Desde el punto de vista celular, tropismo viral, es la capacidad de un virus para infectar selectivamente un órgano, determinado o influenciado en parte por marcadores de superficie de cada célula, factores virales o del hospedero. Los resultados de laboratorio demuestran que el tropismo viral no está estrechamente vinculado con las manifestaciones clínicas en las aves; de acuerdo con lo

observado en este experimento los sujetos inoculados con la cepa Tecate, presentaron viremias elevadas en órganos determinados aún cuando no se observaron signos clínicos.

Resultados obtenidos en un estudio experimental con cuervos americanos, a través de Ensayo de Placas y TaqMan RT-PCR, reportan más virus aislados de cerebro y corazón, mientras que el RNA del virus fue detectado más frecuentemente en hígado y riñón (Panella *et al.*, 2001). En nuestra investigación la concentración de virus observada en cerebro oscila entre 2.4 y 8.2 UFP. Recapitulando, se infiere que las cepas de VON mexicanas tiene capacidad neuroinvasora, pues al observar los resultados del análisis realizado en el cerebro de las aves en estudio, se confirma que de alguna forma el virus es capaz de atravesar la corteza cerebral y alojarse en este órgano, ocasionando los signos clínicos nerviosos del hospedero.

En anteriores estudios con la cepa NY99 se ha demostrado que bazo, riñón, piel y ojos son los órganos infectados con mas frecuencia; el hígado es el menos posible de albergar virus (Komar *et al*, 2003). Sin embargo, en nuestro estudio se demuestra que con las cepas mexicanas se encuentra una gran densidad de virus en el hígado (2.9-8.1 UFP). En *Quiscalus quiscula* y *Passer domesticus*, inoculados con la cepa NY99 se ha encontrado una alta densidad de partículas virales en piel, este hallazgo concuerda con los resultados de la presente investigación en donde la viremia reportada en piel fue de 7.6 a 8 UFP en ambas especies.

Con los resultados obtenidos es posible afirmar que no existe suficiente evidencia estadística para afirmar que las cepas tengan impacto diferente en las dos especies de aves. Las cepas Tabasco y Tecate tienen un resultado similar, expresado en el promedio de viremia, independientemente de la especie aviar de que se trate. Sin embargo los resultados arrojados por el análisis de *t* de student, permiten observar una diferencia significativa, al menos con el número de muestra estudiada. Los resultados de este estudio describen experimentalmente lo que podríamos asegurar en gran probabilidad es el escenario epidemiológico del Virus del Oeste del Nilo con respecto a dos especies aviares que funcionarían en

Chiapas, como hospederos amplificadores para el agente etiológico. Por supuesto este escenario tendría que demostrarse en condiciones de campo y con el material biológico colectado en vida libre.

La investigación de los ciclos de VON en el neotrópico mexicano y específicamente en Chiapas tiene que hacerse de una manera integral. Monitorear permanentemente la mortalidad aviar de todas las especies, incluidas las dos del estudio, buscar signología clínica en estos vertebrados aviares y otras especies; concentrando la atención en los passerinos y monitorear simultáneamente otros vertebrados superiores incluyendo equinos, caninos y mamíferos silvestres (marsupiales, roedores etc.) son acciones importantes para efectuar de manera inmediata. Esto además debe reforzarse con un monitoreo permanente de las densidades de artrópodos (mosquitos principalmente) y casos de neuropatías y meningo encefalitis diagnosticadas en la población humana. Este esquema podría ser quizás de una manera cronológica (aves, mosquitos, humanos) un enfoque permanente que pudiera indicar el comportamiento del VON en la entidad.

Los estudios experimentales que presentamos aquí son importantes y resulta interesante señalar que la interacción cepa-especie es significativa; este hallazgo tendría que verificarse con otro estudio que considere la plausibilidad biológica.

Un aspecto sin atender, es la presencia de otros flavivirus circulantes en Chiapas, es obligatorio pensar en dengue para especular si se ha estado encubriendo el VON; es altamente factible que el virus esté circulando en la región, por lo que resulta prioritario continuar investigando este agente, para evitar que se convierta en un grave e incontenible problema de salud pública.

Así mismo, es importante considerar la propuesta de realizar estudios entomológicos para reconocer la preferencia alimentaria de los vectores del VON presentes en Chiapas, con la finalidad de analizar las alternativas de prevención.

A pesar del discurso oficial, es posible que las autoridades de salud, tanto humana como animal, no estén preparadas para enfrentar un brote de VON en México. Por eso debe considerarse prolongar el monitoreo y vigilar la presencia de este agente etiológico, a fin de evitar que se propague a la población humana.

En relación con nuestro estudio es conveniente señalar que probablemente el tamaño de la muestra experimental sea una limitación, sin embargo consideramos que nuestros resultados son de una trascendencia biológica innegable, no obstante, resulta incuestionable que esta información es valiosa para el sector salud, donde una de las aplicaciones trascendentes e inmediatas es incrementar las medidas zoonosanitarias para decidir esquemas de acción respecto a posibles brotes y promover la difusión de medidas de prevención y control de vectores.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allen SD, 2000 National Audoban Society the Sibley Guide to Birds. 1a. ed A. Chantideer, Press Ed. New York.
- Allison AB, Mead DG, Gibas SEJ, Hoffman DM, Stallknecht 2004. West Nile Virus Viremia in Wild Rock Pigeons. *Emerg Infect Dis*; 10:2252-2255.
- Austin OL 1994. Families of birds. 1a ed Trillas, México.
- Beasley DWC, Davis T, Estrada-Franco JG, Navarro-López R, Campomanes CA, Tesh RB, Weaver SC, Barret ADT 2004. Genome Sequence and Attenuating Mutations in West Nile Virus Isolate from Mexico. *Emerg Infect Dis*; 10:2121- 2224.
- Bernard KA and Kramer LD 2001. West Nile Virus Activity in the United States, 2001. *Viral Immunology*; 14:319-338.
- Berrocal L, Peña J, González M, Mattar S 2006. Virus del oeste del Nilo: ecología y epidemiología de un patógeno emergente en Colombia. *Rev Sal Pub*; 8:2.
- Blitvich BJ, Fernández-Salas I, Contreras-Cordero JF, Marlenee NL, González-Rojas JI, Komar N, Gubler DJ, Calisher CH, Beaty BJ 2003. Serologic evidence of West Nile Virus infection in horses, Coahuila State, México. *Emerg Infect Dis*; 9:853-856.
- Brault A, Langevin SA, Bowen RA, Panella NA, Biggerstaff BJ, Miller BR, Komar N 2004. Differential Virulence of West Nile Strains for American Crows. *Emerg Infect Dis*; 10:2161-2168.
- Brinton M 2002. The Molecular Biology of West Nile Virus: A New Invader of the Western Hemisphere. *Annu Rev Microbiol*; 56:371-402.
- Carrada TB 2004. Encefalitis por virus Nilo-Oeste: Epidemiología, ecología, diagnóstico y prevención. *Rev Mex Patol Clin*; 51:6-15.
- CPA, UADY, UANL, CENACEVE Y SEMARNAT 2006. Accessed May 15 2007 at <http://www.cenave.gob.mx/von/default.asp?id=24>
- Cubría JM, Fernández HAA, González CA, Ruiz PEF, De León GM 2004. Fiebre del Nilo Occidental. *Bol de la Fac de Est Sup Zaragoza UNAM*.
- Christensen, A. 2000. "The Fifteenth- and twentieth-century colonization of the Basin of Mexico by the Great-tailed Grackle (*Quiscalus mexicanus*)" (On-line). Accessed March 2, 2002 at <http://animaldiversity.ummz.umich.edu/local/redirect.php/http://www.blackwell-science.com/geb>.
- Deardorff E, Estrada-Franco JG, Brault AC, Navarro-López R, Campomanes CA, Paz RP, Solis HM, Ramey WN Davis CT, Beasley DWC, Tesh RB, Barret ADT, Weaver SC 2006. Introductions of West Nile Virus Strains to Mexico. *Emerg Infect Dis*; 12:314-318.
- Diéguez FL, García GGG, Herrera LO, Ponce PA, Guerrero C 2003. La Difusión del Virus de la Fiebre del Oeste del Nilo Occidental (West Nile). Principales Consideraciones para su prevención y control. *Arch Med de Camaguey*; 7:4.
- Dohm DJ, Turell MJ 2001. Effect of Incubation at Overwintering Temperatures on the Replication of West Nile Virus in New York *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 38(3):462-464.

- Estrada-Franco JG, Navarro-López R, Beasley DWC, Carrara AS, Travassos da-Rosa, A, Clements T, Wang E, Ludwing GV, Campomanes-Cortes A, Paz-Ramírez P, Tesh RB, Barret, ADT and Weaver SC 2003. West Nile Virus in México; Evidence of Widespread Circulation since July 2002. *Emerg Infect Dis*; 9: 1604-1607.
- Estrada-Franco JG, Navarro-López R, Jerome EF, Cordova D, Clements T, Moncayo A, Kang W, Gómez-Hernández C, Rodríguez-Dominguez G, Ludwing GV, Weaver SC 2004. Venezuelan Equine Encephalitis Virus, Southern Mexico. *Emerg Infect Dis*; 10: 2113-2121.
- Fernández SI, Garza RML, Beaty BJ, Ramos JJ, Rivas EAM 2007. Presencia del Virus del oeste del Nilo en el noreste de México. *Salud Pub de México*; 49:210-217
- Fields-Virology (Two Vols) 4th ed. 2001 by Bernard N Fields (Editor), Peter M, MD Howley, Diane E, Griffin, Robert A, Lamb, Malcolm A, MD Martin, Bernard Roizman, Stephen E, Md Straus, David M, Ph. Knipe, By Lippincott Williams & Wilkins.
- Garrido PS, Beltrán MA, Piña GO, Hernández ME 2004. Estudio Serológico de Arbovirus en población expuesta en Municipios de riesgo en Tabasco, México. *Salud en Tabasco*; 10:275-281
- Goddard LB, Roth AE, Reisen WK and Scout TW 2002. Vector Competence of California Mosquitoes for West Nile Virus. *Emerg Infect Dis*; 8:1385-1391.
- Guía de Aves Canoras y de Ornato 1997. SEMARNAP y CONABIO, 1ª. ed.
- Gubler D and Petersen LR 2002. *Viral Zoonoses*, ACP Inf Dis XXXI, WebMD Inc. All rights reserved, August 2002 Update 9.
- Guzmán MG, Kouri G, Pelegrino JL 2001. Enfermedades virales emergentes. *Rev Cubana Med Trop*; 53:5-15
- Halstead SB et al. (1973). Studies on the immunization of monkeys against dengue I. protection derived from single and sequential virus infections. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 22:365-374.
- Halstead SB, Rojanasuphot S, Sangkawibha N (1983). Original antigenic sin in dengue. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 32:154-156.
- Haydon SD, Cleaveland S, Taylor LH, Laurenson K 2002. Identifying Reservoirs of Infection: A Conceptual and Practical Challenge. *Emerg Infect Dis*; 8:1468-1473.
- Hayes ED, Sejvar JJ, Kaki RS, Lanciotti RS, Bode AM, Campbell GL 2005. Virology, Pathology, and Clinical Manifestations of West Nile Virus Disease. *Emerg Infect Dis*; 11:1174-1179.
- Hayes ED, Komar N, Nasci RS, Montgomery SP, O'Leary DR, Campbell GL 2005. Epidemiology and Transmission Dynamics of West Nile. *Emerg Infect Dis*; 11:1167-1173.
- Howell SNG and Webbs S 1995. *A Guide to the birds of México and Northern Central America*. Oxford, University Press. 740-741,764.
- Huhn GD, Sejvar JJ, Montgomery S 2003. West Nile virus in the United States: an update on an *Emerg Infect Dis*; *American Family Physician*.

- Izaguirre RR, López GLE, Richard CJA, Mesa SJA, Herrera BO 2003. Infección por Virus del Nilo Occidental. *Rev de Esp Médico-Quirúrgicas*; 8:5-7.
- Joyner PH, Nelly S, Shreve AA, Snead SE, Sleeman JM, Pettit D 2006. West Nile Virus en Raptors from Virginia during 2003. *Clinical, Diagnostic and Epidemiologic Findings. J of Wild Dis*; 42:335-344.
- Jourdain E, Schuffenecker I, Korimbocus J, Reynard S, Murri S, Kayser, Y, Gauthier-Clerc M, Sabatier P, Zeller HG 2007. West Nile Virus in Wild Resident Birds, Southern France, 2004. *Vector-Borne and Zoon Dis*; 7:448-452.
- Kilpatrick MA, Daszark P, Jones MJ, Marra PP, Kramer LD, 2006. Host heterogeneity dominates West Nile virus transmission. *Proceedings of the Royal Society B*; 1-7.
- Komar N, Langevin S, Hinten S, Nemeth N, Edwards E, Hettler D, Davis B, Bowen R, Bunning M 2003. Experimental Infection of North American Birds with the New York 1999 Strain of West Nile Virus. *Emerg Infect Dis*; 9:311-322.
- Komar N y Clark GG 2006. West Nile virus activity in Latin America and the Caribbean. *Rev. Panam Salud Pública*; 2:112-117.
- Komar N 2003 West Nile Virus: Epidemiology and Ecology in North America. *Advances in Virus Research*, vol. 61. Centers for Disease Control and Prevention, Div of Vector-Borne Infect Dis; Fort Collins, Colorado.
- Koby P 2002. "Quiscalus mexicanus" (On-line), Animal Diversity Web. http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Quiscalus_mexicanus.html. Accessed October 12, 2007.
- Kruse H, Kirkemo AM, Handeland K 2004. Wildlife as Source of Zoonotic Infections. *Emerg Infect Dis*; 10:2067-2072.
- Langevin SA, Brault AC, Panella NA, Bowen RA and Komar N 2005. Variation in Virulence of West Nile Virus Strains for House Sparrows (*Passer domesticus*). *Am J Trop Med*; 72:99-102.
- Langevin SA, Bunning M, Davis B and Komar N 2001. Experimental Infection of Chickens as Candidate Sentinels for West Nile Virus. *Emerg Infect Dis*; 7:726-729.
- Lichtensteiger CA, Heinz-Taheny K, Osborne TS, Novak RJ, Lewis BA and Firth ML 2003. West Nile Virus Encephalitis and Myocarditis in Wolf and Dog. *Emerg Infect Dis* 10:1303-1306.
- Lozano A and Filipe AR 1998. Anticuerpos frente a Virus West Nile y otros virus transmitidos por artrópodos. *Rev Esp Salud Pública*; 72:245-250
- Mackensie JSD, Gubler and Petersen L 2004. Emerging flavivirus: The spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nature Med Supplement*; 10:98-109.
- Marra PP, Griffing S, Caffrey C, Marm KA, Mclean R, Brand C, Saito, E, Dupuis, AP, Kramer, L, Novak, R 2004. West Nile Virus and Wildlife. *BioScience*; 54:393-402
- Mills JN and Childs JE 1998. Ecologic Studies of Rodents Reservoirs: Their Relevance for Human Health. *Emerg Infect Dis*; 4:529-537
- Molaei G and Andreadis TG 2006. Identification of avian and mammalian in *Aedes vexans* and *Culiseta melanura* (Diptera: Culicidae) and its implication for West Nile Virus transmisión in Connecticut, U.S.A. *J. Med Entomol*; 43:1088-1093.

- Montaño HJA 2002. El Virus de la Fiebre del Oeste del Nilo. *Im Vet*; 2:7-9.
- Nemeth N, Gould D, Bowen R, Komar N 2006. Natural and Experimental West Nile Virus Infection in Five Raptor Species. *J of Wild Dis*; 42:1-13.
- OPSS. 2000. El Virus del Nilo Occidental en las Américas. *Bol Epid*; 21:4.
- OPS-CDC. 2004. III Reunión Conjunta de las Redes de Vigilancia de Enfermedades Infecciosas Emergentes y Reemergentes. Febrero, Atlanta, Georgia.
- Organización Panamericana de la Salud (OPS). Módulos de principios de epidemiología para el control de las enfermedades. 2ª. Ed. Washington DC; OPS, 2002. Modulo tres.
- Peña J, Berrocal L, González M, Ariza K, Mattar S 2005. West Nile Virus: Perspective In The Vertebrate World. *Rev. MVZ Cordoba*; 10:593-601.
- Petersen LR and Roehrig JT 2001. West Nile Virus: A Reemerging Global Pathogen. *Rev Biomed*; 12:208-216
- Petersen LR 2003. West Nile Virus Overview: United States, CDC, Fort Collins, CO.
- Ramos C y Falcón LJA 2004. La fiebre del Nilo occidental: una enfermedad emergente en México. *Salud Pública Méx*; 46:488-490.
- Rappole JH, Derrickson SR, Hubálek Z 2000. Migratory Birds and Spread of West Nile Virus in the Western Hemisphere. *Emerg Infect Dis*; 6:319-328
- Rappole JH and Hubalek Z 2003. Migratory birds and West Nile Virus. *J of Apl Microb*; 94:47S-58S.
- Rivero JRA 2006. Enfermedades infecciosas emergentes: transmisión por la Transfusión sanguínea. *Inst de Hem e Inmun de La Habana, Cuba*.
- Robbins, ChS, Brauun B, Zim HA. Guide to fields Identification, Birds of North America. Golden Books, New York.
- Roof J 2001. "Passer domesticus" (On-line), Animal Diversity Web. http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/information/Passer_domesticus.html Accessed October 12, 2007.
- Salim M, Parra M y Torres J 2005. Limitaciones para el serodiagnóstico del virus del oeste del Nilo en zonas endémicas con co-circulación de Flavivirus en el Caribe colombiano. *Colomb Med*; 36:179-185.
- Torpy JM 2003. West Nile Virus. *JAMA*; 290:558
- Tory PR and Chalif, EL 1995. A Field Guide to Mexican Birds, México, Guatemala, Belize, El Salvador. Houghton Mifflin Company, Boston-New York.
- Turell MJ, O'Guinn M, Oliver J 2000. Potential for New York Mosquitoes to transmit West Nile Virus. *Am J Trop Med Hyg* 62(3):413-414.
- Tyler KL, Granoff A and Webster R 2004. Patogenesis viral, Academia Press Encyclopedia of Virology. <http://apresslp.gvpi.net/apvirol/lpext.dll?f=templates&fn=main-h.htm>. Traducción y adaptación Pedro E Moran

- Sada de HM, López de MB, Sade de RL 1995. Guía de Campo para las aves de Chipinque, 1ª. Ed. CONABIO.
- Spiegel MR, 2005. Estadística, Ed. Mcgraw-hill, 3a ed
- Stone WB, Okoniewski JC, Therrien JE, Kramer DL, Kauffman EB, Eidson M 2004. Vec Test as Diagnostic and Surveillance Tool fos West Nile Virus in Dead Birds. *Emerg Infect Dis*; 10:2175-2181.
- Programa de Enfermedades Transmitidas por Vector, Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades, SSA México 2005.
- University of Minnesota, Accessed October 08 2007 at <http://enhs.umn.edu/hazards/hazardssite/westnilevirus/molaction.html>
- Valero Nereida 2003. Virus del Nilo Occidental: ¿Un nuevo reto? *Invest Clín*; 44:175-177.
- Vallés X, Sanchez F 2000 West Nile virus: el virus de la fiebre del Oeste del Nilo. *Enf Emerg*; 2:232-238.
- Van Der KMM, Pensaert MB, Nauwynck HJ 2005 West Nile Virus in the vertebrate world. *Arch of Vir*; 150:637-657.
- Vargas GR, Cárdenas LJ, Mateos PA, Montaña HJA 2002 La Enfermedad del Virus del Oeste del Nilo. *Im Vet*; 2:5-6
- Vargas GR, Cárdenas LJ 2002. Mosquitos ornitofilicos transmisores de la encefalitis del Oeste del Nilo en el mundo. *Im Vet*; 2:11-15
- World Health Organization (2007), Accessed <http://www.who.int/csr/en/>.
- Work TH, Hurlburt HS, Taylor RM. 1955 Indigenous wild birds of the Nile delta of potential West Nile virus circulating reservoirs. *Am J Trop Med Hyg*; 4:872-88.
- Yaremych SA, Warner RE, Van de WM 2003. West Nile Virus Detection in American Crows. *Emerg Infect Dis*; 9:1319-1321
- Zielinsky-Gutiérrez E 2004. West Nile Virus and Other Mosquito-borne Infections. In: O'Connell J. editor. *The Health Care of Homeless Persons: A Manual of Communicable Diseases and Common Problems in Shelters and on the Streets. Part I: Mosquito-borne Infections. The Boston Health Care of the Homeless Program.* 181-186

APÉNDICES

Apéndice 1

BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO NIVEL 3

<http://www.medigraphic.com/pdfs/patol/pt-2007/pt074e.pdf>

<http://new.medigraphic.com/cgi-bin/resumenMain.cgi?IDARTICULO=13511&IDPUBLICACION=1400&IDREVISTA=29&NOMBRE=Revista%20Mexicana%20de%20Patolog%C3%83%C2%ADa%20CI%C3%83%C2%ADnica>

Apéndice 2

PROTOSCOLOS DE LABORATORIO

Prueba de neutralización de la Placa-Reducción (PRNT) para la determinación de anticuerpos al virus oeste del Nilo.

Preparación

- Células: Preparar un número suficiente placas de 6 pozos que contengan las células Vero. Las células deben ser confluentes a la hora de la inoculación.
- Muestras del suero: los sueros inactivos para la prueba se calentaran en un baño de agua a 56 grados C por 30 minutos.

Materiales:

Medio BA-1: MEM sales conteniendo 1% albúmina de suero bovino, 250 mg/l del bicarbonato de sodio, 50 μ L de gentamicina y 2.5 ug de la anfotericina B por ml en 50 mM Tris, pH 7.6.

Análisis de PRNT

- Preparar diluciones dobles seriales de sueros inactivos en una placa de 96 pozos usando una pipeta multi pozos, con la dilución inicial siendo mitad de lo que se desea para el análisis (es decir si deseas comenzar a probar en 1:5, preparar la primera dilución en la dilución del 1:2.5. El medio BA-1 se utiliza como el diluyente para todas las titulaciones. El método estándar sería poner 120 μ L de BA-1 más 80 μ L del suero inactivo en el primer pozo (1: 2.5 dilución), y 100 μ L de BA-1 en el resto de los pozos usados para la dilución de esa muestra. Serialmente transferir 100 μ L abajo de la línea (a la media) dilución final deseada, desechando al final 100 μ L.
- Preparar el virus diluyendo un stock conteniendo 200 pfu aproximadamente por 0.1 ml (éste será diluido por la mitad con la muestra del suero para rendir 100 pfu/0.1 ml).
- Usar la pipeta multicanales, poner 100 μ L del virus en cada uno de los pozos que contengan diluciones del suero. Tener cuidado para no sumergir las puntas de la pipeta en la muestra. Cuando se ha inoculado una placa, mezclar la muestra con el virus dentro de cada pozo; no hacer esto de manera vigorosa para no contaminar las muestras.
- Incubar las muestras a 4-5 °C durante la noche (refrigerador).
- Inocular las 6 placas de Vero con las mezclas del suero con el virus: descargar el medio a las células Vero e inocular 0.1 ml de cada muestra por pozo en las placas de 6 pozos. Se procede hacer la dilución más alta del suero al más bajo, así no se tiene que cambiar la pipeta entre diluciones de una muestra dada. Se recomienda antes de meter a la incubadora las

muestras, mover suavemente las placas con la finalidad de cubrir todos los pozos con células.

- Incubar las placas inoculadas en 37° C por 45 a 60 minutos, con balanceo para distribuir el medio cada 15 minutos.
- Medir con una pipeta 3 ml de primer recubrimiento (teñido) por pozo: descargar el recubrimiento sobre el lado del pozo para evitar dañar la monocapa.
- Incubar las placas 2 días a 37°C en una incubadora de CO₂.
- Medir con una pipeta 2-3 ml por pozo el segundo recubrimiento.
- Se cuentan como resultado el número de placas al día 3 y 4 después de la inoculación inicial.
- Por cada análisis, incluyendo negativos (No. suero = BA-1) controles (por lo menos 3 pozos) y un control positivo (suero inmune).

Ensayo de placas para Virus del Oeste del Nilo

Preparación.

- Células: Preparar un número suficiente de células Vero para contener las seis placas. Las células deben estar confluentes a la hora de la inoculación.
- Muestras de suero: los sueros se deben congelar típicamente, después de coleccionar y descongelar una sola ocasión.
- Los tejidos se colocan en 9 veces su volumen de medio BA-1 y se homogenizan por 5-10 movimientos en una Ten Broeck grinder. Los homogenizados se clarifican por centrifugación (50000 x g por 5 minutos) se prueban inmediatamente.

Ensayo de placas.

- Preparar diez diluciones seriales etiquetadas de suero o tejido homogenizado en medio BA-1. Generalmente las diluciones son preparadas en placas de 96 pozos. Cuando se analicen muestras de sueros de mamíferos para VON (ej. Caballos) se inicia con el suero sin diluir.
- Inocular 1 ml de cada dilución de la muestra en el fondo de la placa de seis pozos.
- Incubar 45-60 minutos con rotaciones cada 15 minutos.
- Agregar 2 ml de la primera solución de recubrimiento a cada uno.

- Dos días después de la inoculación, agregar dos ml. de la segunda solución de recubrimiento en cada pozo.
- Examinar las placas y registrar el número en cada uno de los pozos los días 3, 4 y 5 después de la inoculación. Para los pozos que contengan aproximadamente más de 150 placas, registre "TN" para indicar "demasiado numeroso".
- Los títulos de virus por ml de material original se calcula como el numero de placas en un pozo (un promedio de múltiples pozos inoculados con la misma dilución) los tiempos de dilución por el pozo contando diez tiempos (porque cada pozo fue inoculado con 0.1 ml). idóneamente los títulos son calculados usando pozos que contienen entre 30 y 100 placas.

Material.

Medio BA-1: MEM Conteniendo 1% de albúmina de suero bovino, 250 mg/L de bicarbonato de sodio, 50 µl de gentamicina y 2.5 µl de anfotericina B por ml en 59 mM de Tris, pH de 7.6.

Primer recubrimiento.

- Preparar el medio 2X. MEM sin rojo de fenol preparado dos veces en su concentración normal y suplementar con suero fetal bovino al 4%, 200 UI de penicilina G/ml, 100 µl de estreptomycin/ml. Calentar a 45° C.
- Preparar agarosa 2x. derretir la agarosa al 1% en agua usando un microondas y enfriar a 45° C.
- Mezclar igual volumen de medio 2X y agarosa 2X, agregar 3 ml de NaHCO₃ al 7.5% por 100 ml de solución. Mantener a 45° C hasta su uso.

Segundo recubrimiento. Idéntico al primer recubrimiento excepto por la adición de rojo neutral (3.3 gramos/litro) a 0.005% de concentración final.

ANEXOS

Anexo 1

PERMISO PARA ENVIO Y TRANSPORTACIÓN DE MUESTRAS Y BIOLÓGICOS AL CDC, FORT COLLINS

| U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE ANIMAL AND PLANT HEALTH INSPECTION SERVICE WASHINGTON, DC 20250 PERMISO PARA EL ENVÍO Y TRANSPORTACIÓN DE MUESTRAS Y BIOLÓGICOS AL CDC, FORT COLLINS | | PERMISIÓN 03591 000000000 |
|--|--|---------------------------------|
| UNITED STATES VETERINARY PERMIT FOR IMPORTATION AND TRANSPORTATION OF CONTROLLED MATERIALS AND ORGANISMS AND VECTORS | | DATE ISSUED 01/21/2011 |
| NAME AND ADDRESS OF SHIPPER CENTRO REGIONAL DE INVESTIGACION EN ZOOLOGÍA Y PATOLOGÍA DE AVES Y DE INSECTOS MEXICALTEPEC, CHIAPAS C. P. 29002 MEXICO | | DATE RECEIVED 01/21/2011 |
| NAME AND ADDRESS OF PERMITTED RECIPIENT OF USE AND TRANSPORT Dr. Nicholas Potts Division of Field Operations, Control and Inspection 1324 S. Cooper Road Fort Collins Campus Fort Collins, Colorado 80525 970-221-1414 | | USE PERMITTED AS RESEARCHER |
| NO. REGISTERED IN YOUR APPLICATION YOU ARE AUTHORIZED TO EXPORT OR TRANSPORT THE FOLLOWING MATERIALS: 1) Dead and frozen samples (avian origin) 2) Dead mosquitoes for diagnostic testing | | MAILED BY TRANSPORTER 2011 |
| <p>RESTRICTIONS AND PRECAUTIONS FOR TRANSPORTING AND HANDLING MATERIALS AND ALL DERIVATIVES</p> <p>The owner, carrier, consignee, importer, exporter, or other party shall be responsible for the safe handling, packaging, and transportation of the materials and derivatives. The owner, carrier, consignee, importer, exporter, or other party shall be responsible for the safe handling, packaging, and transportation of the materials and derivatives. The owner, carrier, consignee, importer, exporter, or other party shall be responsible for the safe handling, packaging, and transportation of the materials and derivatives.</p> <p>1. This permit is invalid without permittee's signature.</p> <p>2. This permit is valid only for the purpose and conditions specified herein and is subject to the restrictions and precautions as are specified in this permit.</p> <p>3. This material is prohibited from the following countries where highly pathogenic avian influenza (HPAI) subtype H5N1 exists: Cambodia, China, Indonesia, Japan, Kazakhstan, Laos, Malaysia, Romania, Russia, South Korea, Thailand, Turkey, and Vietnam.</p> <p>4. All samples must be packaged in your laboratory level 3 facility which has been inspected by the staff of the CDC. This facility shall be re-inspected every 3 years.</p> <p>5. Permitted mail, notify USDA, Animal Veterinary Services within 48 hours of failure of export or a statement of water-aid. Permitted to contact: (303) 446-1079.</p> <p>6. Shipping facility is subject to routine inspection by USDA, APHIS personnel during normal business hours to ensure compliance with permit conditions.</p> <p>Continued on subsequent page(s).</p> <p>TO EXPORT OR IMPORT AT THE PORT OF ENTRY: ALL OF THE ABOVE MATERIALS ACCOMPANYING THE SHIPMENT SHALL BEACCOMPANIED BY THIS PERMIT.</p> | | |
| Shipped Fort Collins  | Title Veterinary Medical Officer National Center - Import - Export | RECEIVED |

VP FORM 1-6A, MAR-02

Replaces VP Form 1-6A and 1-6B which are obsolete

Page 1 of 2

Anexo 2

PERMISO PARA TRANSPORTACION DE AVES



**SUBSECRETARÍA DE GESTIÓN
PARA LA PROTECCIÓN AMBIENTAL**

DIRECCIÓN GENERAL DE VIDA SILVESTRE

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

OFICIO NÚM. SGPA/DGVS/ 01671 /06

MÉXICO, D. F., A 16 MAR. 2006

"2006, Año del Bicentenario del Natalicio del Benemérito de las Américas, Don Benito Juárez García"

M.V.Z. SERGIO GUERRERO SÁNCHEZ
INSTITUTO DE HISTORIA NATURAL Y ECOLOGÍA
DIRECCIÓN DEL ZOOLOGICO REGIONAL
MIGUEL ÁLVAREZ DEL TORO
CALZADA CERRO HUECO S/N, EL ZAPOTAL,
29000-TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS
TEL. 01 (961) 6144701
ekio@yahoo.com

Considerando que ha dado cumplimiento a los requisitos establecidos para efectuar investigación y colecta científica de flora y fauna silvestres en territorio mexicano y con fundamento en el Artículo 32 Bis fracciones I, III, V, XXII, XXXIX de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; Artículos 5 fracción XI, 79, fracciones I, II, III, VI y VII, 80 fracción I, 82, 83 y 87 de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente; Artículo 31, fracción VI del Reglamento Interior de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Artículos 1º, 97 y 98 de la Ley General de Vida Silvestre; Título Sexto, Capítulo I, Artículo 85, fracciones I, II, III, IV, V y VI, Capítulo II, Artículo 88, fracciones I, II y VI, Capítulo IV, Artículo 105, fracciones II y III del Reglamento de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente en Materia de Áreas Naturales Protegidas (ANP's); las disposiciones relativas de la Norma Oficial Mexicana NOM-126-SEMARNAT-2000, por la que se establecen las especificaciones para la realización de actividades de colecta científica de material biológico de especies de flora y fauna silvestres y otros recursos biológicos en el territorio nacional; la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2001, protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo, la Dirección General de Vida Silvestre **autoriza** la colecta definitiva de hasta **diez (10) ejemplares** por cada una de las especies "paloma perdiz común" *Leptotila verreauxi*, "zanate mexicano" *Quiscalus mexicanus*, "zorzal pardo" *Turdus grayi*, "tordo cantor" *Dives dives*, "chara verde" *Cyanocorax yncas*, "tortola collilarga" *Columbina inca*, "zopilote" *Coragyps atratus* y "garza ganadera" *Bubulcus ibis*. Las actividades se llevarán a cabo en El Zapotal del Municipio de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. Esta autorización tendrá una vigencia a partir de la fecha de expedición de la presente y hasta el 15 de marzo del año 2007.

La presente se expide en apoyo a las actividades inherentes al desarrollo del proyecto denominado "Determinación de la susceptibilidad de aves silvestres del Estado de Chiapas a dos aislados mexicanos del Virus del Oeste del Nilo", que llevará a cabo el Instituto de Historia Natural y Ecología, debiendo sujetarse obligatoriamente a las siguientes condiciones:

1.- Deberá cumplir con las disposiciones establecidas en la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente y su Reglamento en Materia de Áreas Naturales Protegidas y demás disposiciones legales aplicables.

2.- Obligatoriamente y previo al inicio de las actividades de campo, deberá contactar a responsables o encargado del Área El Zapotal, lo anterior para coordinar las actividades de campo con el ANP, presentar su programa de actividades, lista de participantes y fechas en que pretende ingresar al ANP; así mismo se le asignará el personal del ANP que lo acompañará durante los trabajos de campo y deberá acatar las indicaciones y recomendaciones que le haga dicho personal.



SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE
Y RECURSOS NATURALES

**SUBSECRETARÍA DE GESTIÓN
PARA LA PROTECCIÓN AMBIENTAL**
DIRECCIÓN GENERAL DE VIDA SILVESTRE

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

OFICIO NÚM. SGPA/DGVS/01671 /06

MÉXICO, D. F., A 16 MAR. 2006

"2006, Año del Bicentenario del Natalicio del Benemérito de las Américas, Don Benito Juárez García"

3. - En la realización del proyecto propuesto, se responsabilizará al titular de la investigación de cualquier impacto significativo que resulte sobre las poblaciones de la flora o fauna silvestres y sus hábitats, por lo que deberá considerar el riesgo de perturbación del ecosistema, antes de su ejecución y no llevarlo a cabo si existe algún riesgo.
4. - Previo al inicio de las actividades de campo, deberá enviar obligatoriamente por escrito y utilizando cualquier medio su programa de trabajo a las Delegaciones Federales de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales en el Estado de Chiapas (Tel. 01 (961) 617 50 12), enviando copia del mismo a la Dirección General de Vida Silvestre. De igual manera, al término de dichas actividades lo notificará a esa Delegación Federal, enviando un reporte detallado por escrito.
5. - Con base al Capítulo IV, Artículo 98 de la Ley General de Vida Silvestre, el responsable del proyecto deberá someter a la consideración de la Dirección General de Vida Silvestre, en un plazo no mayor de 30 (TREINTA) días de concluida la vigencia de la presente, un informe que describa **detalladamente** las actividades realizadas, especificando el número de ejemplares colectados por especies, los resultados obtenidos, la problemática del área trabajada, las potenciales alternativas de solución y -en su oportunidad-, la(s) publicación(es) y sobre tiros producto de la investigación.
6. - **La totalidad del material colectado deberá destinarse exclusivamente a los fines específicos del proyecto, objeto de la presente autorización.** Con base al Capítulo IV, artículo 98 de la Ley General de Vida Silvestre, el material colectado deberá ser analizado y depositado en la Unidad de Aislamiento del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología del INIFAP, donde el titular de la investigación, asume la responsabilidad de remitir a esta Dirección General, copia de la(s) constancia(s) de los depósitos debidamente firmadas, especificando la cantidad de material depositado.
7. - Queda estrictamente **prohibido** efectuar cualquier aprovechamiento de las especies de flora y fauna silvestres, cualesquiera que sea su estatus, excepto lo aquí autorizado, así como realizar actividades en áreas naturales protegidas de México, sean Estatales o Federales, sin previa autorización.
8. - **De acuerdo al Artículo 87 de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente y al Capítulo IV, Artículo 97 de la Ley General de Vida Silvestre, esta autorización no ampara el aprovechamiento de los especímenes colectados para fines comerciales, ni de utilización en biotecnología.**

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

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



SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE
Y RECURSOS NATURALES

**SUBSECRETARÍA DE GESTIÓN
PARA LA PROTECCIÓN AMBIENTAL**

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

OFICIO NÚM. SGPA/DGVS/01071/06

MÉXICO, D. F., A

16 MAR. 2006

"2006, Año del Bicentenario del Natalicio del Benemérito de las Américas, Don Benito Juárez García"

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

ATENTAMENTE

SUFRAGIO EFECTIVO. NO REELECCIÓN.

EL DIRECTOR GENERAL

FELIPE RAMÍREZ RUIZ DE VELASCO

- C.c.p. C. Felipe Adrián Vázquez Gálvez.- Subsecretario de Gestión para la Protección Ambiental.- Edificio.
- C. Luis Fuego Macdonald.- Director General de Inspección y Vigilancia de los Recursos Marinos, Ecosistemas Costeros y Vida Silvestre, PROFEPA.- Carr. Picacho Ajusco No. 200, 6º. Piso, Col. Jardines de la Montaña, Delegación Tlalpan, C.P. 14210, México D. F.
- C. Juan Carlos Cal y Mayor Franco.- Delegado Federal de la SEMARNAT en el Estado de Chiapas.- Blvd. San Cristóbal No. 212, Col. Moctezuma, C.P. 29030, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.
- C. David Gutiérrez Carbonell.- Director General de Manejo para la Conservación de Áreas Naturales Protegidas, Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas.- Carr. Picacho Ajusco No. 200, 6º. Piso, Col. Jardines de la Montaña, Delegación Tlalpan, C. P. 14210, México, D. F.
- C. Fernando Sánchez Camacho.- Jefe del Departamento de Análisis para el Aprovechamiento de Otras Especies. Edificio.

Archivo General (09/C2-1955/02/06)

Minutario

c:colecta/cientifica/Permisoespecial2006/Sergio-Guerrero_VON.doc (13/03/06)

Anexo 3

REGISTRO DE TOMA DE MUESTRAS SEROLOGICAS Y PESO DE LAS AVES

REGISTRO DE PESO (en gramos)

LOTE # 1 AVES INFECTADAS CON CEPA TABASCO

| AVE | DIAS | | | | | | | |
|-----------|------|----|----|----|----|----|----|----|
| | D0 | D1 | D2 | D3 | D4 | D5 | D6 | D7 |
| Gorrión 1 | 20 | 23 | 19 | 25 | 20 | 20 | 25 | 25 |
| Gorrión 2 | 20 | 18 | 18 | 21 | 24 | 20 | 20 | 25 |
| Gorrión 3 | 20 | 27 | 22 | 25 | 25 | 20 | 25 | 25 |
| Gorrión 4 | 23 | 31 | 22 | 25 | 20 | 20 | 25 | |
| Gorrión 5 | 32 | 20 | 20 | 20 | 20 | 19 | | |
| Gorrión 6 | 28 | 20 | 20 | 25 | 25 | 22 | 25 | 20 |

| | | | | | | | | |
|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Zanate 1 | 110 | 106 | 105 | 90 | | | | |
| Zanate 2 | 135 | 121 | 120 | 125 | 120 | 110 | 105 | 100 |
| Zanate 3 | 121 | 110 | 100 | 109 | 105 | | | |
| Zanate 4 | 120 | 120 | 100 | 110 | 118 | 100 | 100 | |
| Zanate 5 CONTROL | 106 | 105 | 105 | 100 | | | | |

LOTE # 2 AVES INFECTADAS CON CEPA TECATE

| | | | | | | | | |
|------------|----|----|----|----|----|----|----|----|
| Gorrión 8 | 30 | 20 | 20 | 22 | 25 | | | |
| Gorrión 9 | 24 | 20 | 22 | 25 | 25 | 25 | 20 | 35 |
| Gorrión 10 | 21 | 20 | 20 | 22 | 25 | 25 | 20 | 25 |
| Gorrión 11 | 25 | 20 | 25 | 22 | 25 | 25 | 30 | 20 |
| Gorrión 12 | 20 | 26 | 23 | 20 | 20 | 20 | | |
| Gorrión 13 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 | 25 |

| | | | | | | | | |
|------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Zanate 6 CONTROL | 110 | 110 | 105 | 110 | 120 | 120 | 120 | 120 |
| Zanate 7 | 120 | 120 | 110 | 115 | 120 | 120 | 125 | 120 |
| Zanate 8 | 100 | 100 | 100 | 115 | 105 | 110 | 100 | 100 |
| Zanate 9 | 105 | 95 | 105 | 105 | 95 | | | |
| Zanate 10 | 115 | 120 | 120 | 120 | 110 | 120 | 120 | 120 |

Pathogenicity of two Mexican isolated of the West Nile Virus (WNV), in *Quiscalus mexicanus* and *Passer domesticus*

María Teresa Trujillo-Olivera*, Sergio Guerrero-Sánchez*, Nicole Nemeth†, Sandra Cuevas ‡, Nicholas Komar † and José Guillermo Estrada-Franco *[‡],

Key words: West Nile Virus, epidemiology of emergent diseases, Mexican wild birds, PRNT, Test of Plates.

Abstract

With the objective to evaluate the role of *Passer domesticus* and *Quiscalus mexicanus* as potential amplifiers of the WNV, it was made an experiment with these species and two Mexican strains of the virus. It was determined the pathogenicity of the isolated viral TM-17103 and BCM-04 by viremias, mortality, antibody neutralizers and virus persistence in organs. The samples were processed by testing plates and PRNT. In *Passer*/Tabasco the average viremias was 6.02 (\log_{10} UFP/ml); with Tecate 6.71, *Quiscalus*/Tabasco 7.28 and with Tecate 6.54. The most elevated mortality was 60% in *Quiscalus*/Tabasco, with Tecate was 20%. The survival was presented in major proportion in *Passer*/Tecate. The results suggest that both species are excellent amplifiers of the WNV and that there exists crossed immunity.

The disease by WNV is vectorial, transmitted by ornitophilic mosquitoes *Culex*, *Aedes*, *Anopheles* and others, different birds and mammals function as amplifier carriers, becoming a potential risk for public health (1). In 1937, the WNV is isolated in Uganda (2), the first bud of significant magnitude is presented in New York at the end of the summer of 1999, 62 neurological cases are reported and 7 human deaths (3). In Mexico, is registered the first isolating in Tabasco in 2002 from a common crow (4)

In Chiapas was documented the presence of the WNV by serology in birds, equine and bovine (4). In the region circulate other flavivirus (i.e. dengue and encephalitis from San Luis) but, the cycles of viral circulation are unknown, vectors, reserve, and the way they're manifested in carriers.

The objective of the study was to evaluate the pathogenicity of the two Mexican isolated: Tecate strain (BMC-04) of the nearctic and Tabasco strain and (TM171-03) of the neotropic in *Quiscalus mexicanus* (Mexican Zante) and *Passer domesticus* (domestic sparrow) endemic species of Chiapas; through the viremias in serology, mortality, clinic signs, viral tropism, viral unloading and antibody neutralizers.

Methods

Strains and used birds

It was used strains of the WNV coming from two isolated of *Corvus corax* (common crow).

* Facultad de Medicina Humana, Universidad Autónoma de Chiapas

♦ ZooMAT, Instituto de Historia Natural

† Center for Disease Control, Fort Collins, Colorado, USA

‡ Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología (CENID-INIFAP)

‡ Universidad de Texas en Galveston (UTMB)

First, from southern of Mexican Republic (Strain Tabasco TM-17103, ay 660002) and the second from Northern of Baja California (Strain Tecate BCM-04, DQ 080060), provided by the Mexico- United States Commission for Prevention of Aphthous Fever and other Exotic Diseases of Animals (CPA). 10 *Q. mexicanus* were collected in Chiapas (zanates), and 13 *P. domesticus* (sparrows) in Estado de México, clinically healthy and serologically negative to Encephalitis virus from San Luis and WNV, according to the analysis of the Center of Disease Control (CDC), Fort Collins, Colorado, USA.

Inoculation, sample collection and clinic observation

The experiment lasted 28 days. There were 4 groups: 1) four *Q. mexicanus*/Tabasco; 2) four *Q. mexicanus*/Tecate; 3) six *P. domesticus*/Tabasco and 4) six *P. domesticus*/Tecate, with its control as well. The zero day was inoculated, subcutaneous route, a dose of 10^4 (10,000 UFP), of the strain corresponding to each group. During 7 days after inoculation ($_{dpi}$) were collected serums (1% of living weight of birds) and cloacal and nasopharyngeal hyssops. The 14 day ($_{dpi}$) the groups 2 y 4 were re inoculated with the Strain Tabasco to determine a reaction of crossed immunity, the serums of these groups were collected the days 14, 15, 16 and 28. Daily were registered signs and clinical manifestations in all specimens.

The survived birds were sacrificed the 28th day, during the autopsy were collected samples of viscera, and kept in micro tubes to be sent to the CDC, in Colorado. The serum was obtained by centrifugation, using micropipettes and ends with filter in bell of sterile flow; the hyssops were collected in micro tubes, preserved to $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ and sent to DCD.

Sample process and statistics

Using the technique of Testing of Plates, were analyzed serums, tissues and hyssops for viral isolating, titling by duplicate. The serums were analyzed by Neutralization of Plates Reduction (PRNT) to determine the humoral immune response to experimental infection.

It was used t of Student (95% trustable) and analysis of variance to establish statistically considerable differences. The analysis of variance was realized in SPSS, to compare the pathogenicity of the strains the two species of birds, on the following model:

$$Y_{ij} = \mu_o + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + e_{ij}$$

Results

Viremias

Four specimens *P. domesticus*/Tabasco manifested constant viremias in the first 3 $_{dpi}$, disappearing the 4 $_{dpi}$; two specimens died in the 5 y 6 $_{dpi}$ keeping high viremias. The titles oscillated between 2.0 and 8.04 (viremia \bar{x} = 7.8).

Viremia in *P. domesticus*/Tecate lasted 7 days in 2 of the 4 alive specimens during the experiment, observing titles of 2.7 and 10 al 4 $_{dpi}$ (viremia \bar{x} = 9.5). The maximum titles were detected to 3 $_{dpi}$ in dead infected specimens (9.5 y 10.1), the group had viremias between 2.3 y 10.1, and non signology.

The viremias in *Q. mexicanus*/Tabasco were between 2.5 y 10.2, (viremia \bar{x} = 9.6). The maximum title was registered to 4-5 $_{dpi}$ diminished to 8.5 el 6 $_{dpi}$; dying the 7th day. The mortality was presented since the third day in a specimen with viremia of 8.2.

For *Q. mexicanus*/Tecate was detected elevated and constant viremias between 2.2 and 10.3, during the first week (viremia \bar{x} = 9.3).

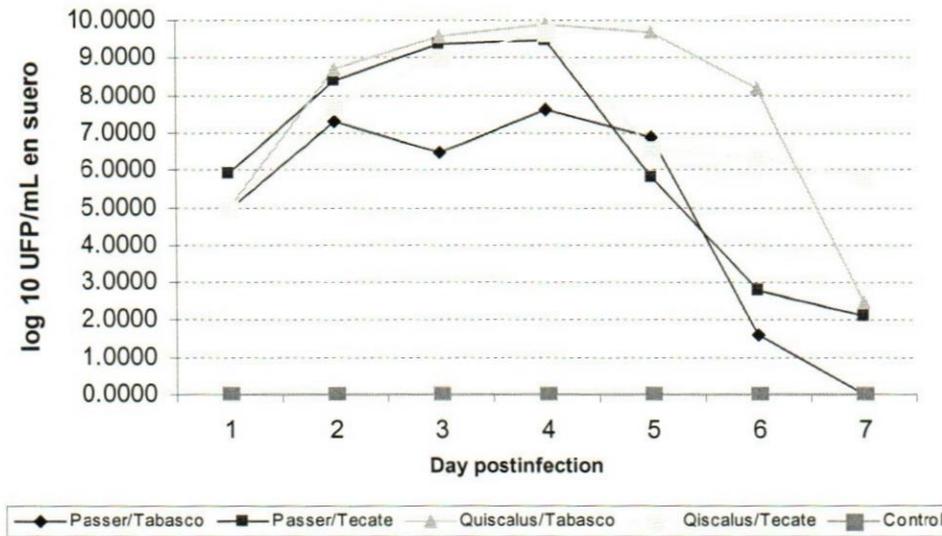


Figure 1. Comparative West Nile virus viremia profiles for birds and strain.

Clinic Signology

In the group of *P. domesticus*/Tabasco, only two birds showed little activity, one of these specimens lost weight ($\approx 40\%$), died the el 5_{dpi}. The rest continued feeding themselves.

P. domesticus/Tecate did not appear clinical signs or corporal weight decreasing.

Q. mexicanus/Tabasco presented bristly feathers, declining and stopped eating losing weight as result. The specimens of the group *Q. mexicanus*/Tecate showed bristly feathers, declining, rigid neck and lethargy, the weight did not change, only died a specimen with neurological signs.

Mortality

The greater rates (60%) were noticed in *Q. mexicanus*/Tabasco, the death occurred since the 3_{dpi}. In *P. domesticus*/Tabasco la mortality was 28.6%, from the 5_{dpi}. In *P. domesticus*/Tecate was presented 4_{dpi} (33.3%); the smaller proportion (20%) occurred in *Q. mexicanus*/Tecate, 5_{dpi}, with titles in reduction.

Wounds to Autopsy and Viral Tropism

During the autopsy was observed, splenomegalia, splenic congestion, enlarging of pancreas, thickening of the wall of the intestinal mucosa, kidney congestion, brain venocongestion and swelled meninges.

In *P. domesticus*/Tabasco, viral tropism goes to kidney, liver, Heart and lung. In *P. domesticus*/Tecate death 4 and 5_{dpi} was detected virus in all organs, with a high proportion in brain and lung.

In *P. domesticus*/Tecate was observed viral tropism in lung (9.5); lowest titles, from 1.9 to 5.2 in *P. domesticus*/ Tabasco.

In *Q. mexicanus*/Tecate was observed tropism in all organs, also in *Q. mexicanus*/Tabasco, except intestine and pancreas.

Antibody neutralizers

Serums obtained are 14 and 28_{dpi} of *Q. mexicanus* inoculated for second time, confirmed the infection and evidenced the immunologic bird answer, was found 100% of antibody neutralizers.

Statistic

There were compared the averages of viremia, by inoculated specie with each strain. In *Passer* the calculated value of t ($3.9; 5.9$ y $4.3 > 2.02 = t_t$ with 5 gl) in the first three days _{dpi}. The difference is statistically significant and the strain Tecate is more Pathogenous in *Passer*. In *Quiscalus*/Tabasco the viremia \bar{x} resulted significantly greater than *Quiscalus*/Tecate. The calculated value of t was $3.7 > 2.35$ (t theoretical with 3 gl) in the six days after the inoculation, the Tabasco strain in more Pathogenous for *Q. mexicanus*.

Discussion

Nowadays, there's no evidence about the pathogenicity of circulating strains of the WNV in Mexican land, not much is known about probable amplifier carriers.

It is undeniable that the WNV travels extensively in Mexico and Chiapas, demonstrated by surveys on wildlife and domestic fauna (5). This study is relevant because it represents the first scientific effort decided to explain the complexity of the WNV cycles in Mexico.

A medullar contribution of this study was to taste the hypothesis that two strains of different zoographic regions of Mexico could present differential pathologies in two species of birds which are efficient amplifier carriers *Passer domesticus* and *Quiscalus mexicanus*.

There's evidence that Tabasco strain presents 4 mutations, two of them in the structural proteins and two in the non structural, which would associate, at least, to gene E, with extenuating properties and in murinos models.

This could partially explain the possible, and maybe the ample presence of this phenotype distributed in Southern of Mexico, and that would reveal the absence of the sickness of superior vertebrates in these regions.

The possible generated pathology by Tecate would be similar to the genotypic and phenotypic effect that is observed in experimental studies with NY99, in bird models and that has a difference of three mutations with Tecate (6).

It is observed that both strains generate severe pathologies and interferes that there exists major virulence by Tecate for sparrows and Tabasco for zanates. With basis in major mortality for Tabasco strain (60%) and major prevalence in *Quiscalus*, in the meantime that minimum mortality rate was observed (20%) due to *Passer* infection by Tecate; supported by clinical data observed.

The selection of the objects for study was based on the recognized ability of the *Passer* to get infected with different strains of the WNV, including the NY99 and of a closer member of the *Q. mexicanus* from the same Icteridae family, which is identified as *Q. quiscula*, considered excellent amplifier carriers of the WNV, backed up in studies with isolated strains in America (7).

This capacity recognized since 1950, that experimental infections with African strains (Ar-284) generate titles until 8 UFP (8). In general, conducted studies in the US, fortify the

hypothesis that passeriforms and charadriforms are groups so competent to get infected with the WNV compared to other bird groups (9).

Earlier studies reveal that 100% of the mosquitoes *Culex tarsalis* get infected by blood absorbing with 10^7 UFP concentrations and only 36% get infected with 10^4 UFP of the WNV (10).

It is expected that present mosquitoes in Mexico could, potentially, infect in a significant way, particularly of the genus *Culex*, after feed the species in study.

The detected viremias in this study agree to historical observations. For example, *Passer/Tecate* reached a maximum viremia of 10.1 UFP and with Tabasco 8.4 UFP.

Likewise, *Quiscalus* with both strains, reached values between 9.6 and 10.2 UFP, approximated titles to the reported results with *Quiscalus quiscula* of 11.8 UFP.

Experiments with strains NY99, KEN and KUN or KUNJIN in crows, reveal mortality rates and titles until 9.2 UFP associated to the infection for the first isolated; not like this for strain KUN (11), this evidences the similarity in registered viremias in this investigation and its propensity to infect the family of mosquitoes *Culicidae*.

The diagnostic of 100% of antibody neutralizers in our results, seems to indicate that the immunity to subsequent infections by different strains of the WNV is viable, at least in this bird species and with these Mexican isolated. Although, in 2001, a response was not obtained in experiments with *Q. quiscula* (12)

The consistent results on findings in USA allow us observe that both species are susceptible and might work as amplifier competent carriers for these strains.

Immediately to inoculation *Quiscalus* presented clinical signs and high titles of viruses; not *Passer*, although high viremias were observed, but not signology. This could mean that this specie is immunologically, more competent as amplifier.

In USA have been experiments with birds of prey showing that oral transmission by eating infected birds and/or mammals with the WNV is possible (13); also there's the possibility of transmission by direct contact; using infected birds with controls, has been observed that is viable the infection in absence of the vector (14).

In this study, we manage the specimens with controls, even with elevated titles of viruses in skin, this didn't happened. The exposition period was 28 days only.

In experimental studies, it has been used doses of 10^8 UFP (15), -we dosed 10^4 , emulating the puncture of a vector- considering 10^3 enough infecting dose (16), these guarantees that are susceptible of sickness with low concentrations of viruses.

Our birds developed lethargy, unusual posture, bristly feathers, declining and rigid neck, particularly in *Quiscalus/Tabasco*. These specimens died after 24 hours that signs appeared; alike to the reports to blue magpie and gull (17). Specifically a zanate/Tecate, showed signs if encephalitis (disorientation, rigid neck, convulsions) such as is reported by experimenting with American crowns (*Corvus brachyrhynchos*) and strains NY99, KEN and KUNJIN (18). The findings during the autopsy and titles in lung (4.5-9.5 UFP) let us assume that not all injuries after death are related with viral charge and persistence in organs, now that the lung presented more viral tropism without lesions.

In spite of, in spleen, kidney and brain were found considerable titles of viruses that should relate to pathologic findings.

In studies for dead birds, was founded a major charge in kidney, compared to brain, heart, and lungs (19). Although in our study, the lung seems to be the most affected organ, and kidneys the less ones.

Laboratory results confirm that viral tropism is not linked to clinic signology; now that infected birds with Tecate presented high viremias in organs and signs were not observed. In an experimental study with American crows, using Test of Plates and TaqMAN RT-PCR, reported more brain and heart isolated viruses, meanwhile, the vial RNA was more detected in liver and kidney (20). In our investigation, the viral concentration observed in brain oscillated between 2.4 and 8.2 UFP. It infers that Mexican strains have neuroinvader capacity, which confirms that the virus is capable to pass through brain crust and lodge on it, giving as result, clinical neurological signs.

Studies with NY99 have demonstrated that spleen, kidney, skin, and eyes are the most frequent infected organs; report that kidney has less possibilities to shelter virus (21). Nevertheless, our study registers a great density of virus in kidney (2.9-8.1 UFP). In *Q. quiscula* and *P. domesticus*, inoculated with NY99 strain, found high density of virus in skin, this agrees to our results (7.6 a 8 UFP).

Although doesn't exist a statistical evidence to state that strains have different impact in both species, if they have a similar result, expressing the average of viremia, independent of the specie that it is about. However, the *t* of student, allows observing a significant difference. Our results experimentally describe what we could assure is the epidemiologic scene of the WNV respecting the two bird species of Chiapas, as amplifier carriers. This would have necessarily to be demonstrated in field conditions and with biological material collected in the wild.

The investigation of the WNV in neotropic and specifically in Chiapas has to be by integral way. To monitor permanently bird mortality, search for clinical signology in birds (focusing to the attention in passerines) and mammals (equine, canine, marsupials and particularity rodents); reinforced by permanent monitories of vector densities and neuropathies and meningoencephalitis cases diagnosed in human. Likewise, making entomologic studies to recognize the feeding preference of other circulating flavivirus in Chiapas and analyze alternatives of prevention. The presence of other circulating flavivirus in Chiapas makes think of dengue and speculate if it has covered up the WNV. It is priority to continue investigating this agent to avoid it become a serious and uncontrollable problem for public health.

Probable, the size of our sample has been a limit, even so, we consider that our results are undeniable of biological transcend, valuable information for health sector, useful to increase zoo sanitary health measures and decide schemes of action to face possible buds in the region.

Acknowledgements

We thank J. Frieventh and personnel from the Zacango zoological in Toluca, Mexico and ZooMAT in Chiapas; for assistance in capturing wild birds. We thank personnel the Mexico- United States Commission for Prevention of Aphthous Fever and other Exotic Diseases of Animals (CPA) for provide WNV strains.

References

- 1.- Bernard KA&Kramer LD 2001. West Nile Virus Activity in the United States, 2001. *Viral Immunology*; 14:319-338.
- 2.- Kilpatrick MA, Daszark P, Jones MJ, Marra PP, Kramer LD, 2006. Host heterogeneity dominates West Nile Virus transmission. *Proceedings of the Royal Society B*; 1-7.
- 3.-Berrocal L, Peña J, González M, Mattar S 2006. Virus del oeste del Nilo: ecología y epidemiología de un patógeno emergente en Colombia. *Rev Sal Pub*; 8:2.
- 4.- Gubler D&Petersen LR 2002. *Viral Zoonoses*, ACP Inf Dis XXXI, WebMD Inc. All rights reserved, August 2002 Update 9.
- 5.- Estrada-Franco, 2008. Información obtenida comunicación personal.
- 6.- Spiegel MR, 2005. *Estadística*, Ed. McGraw-hill, 3a ed
- 7.- CPA/SAGARPA, 2005; Estrada-Franco et al información no publicada, 2007
- 8.- Beasley DWC, Davis T, Estrada-Franco JG, Navarro-López R, Campomanes CA, Tesh RB, Weaver SC, Barret ADT 2004. Genome Sequence and Attenuating Mutations in West Nile Virus Isolate from Mexico. *Emerg Infect Dis*; 10:2121- 2224.
- 9.- Komar N, Langevin S, Hinten S, Nemeth N, Edwards E, Hettler D, Davis B, Bowen R, Bunning M 2003. Experimental Infection of North American Birds with the New York 1999 Strain of West Nile Virus. *Emerg Infect Dis*; 9:311-322.
- 10.- Work TH, Hurlburt HS, Taylor RM. 1955 Indigenous wild birds of the Nile delta of potential West Nile virus circulating reservoirs. *Am J Trop Med Hyg*; 4:872-88.
- 11.- Hayes ED, Komar N, Nasci RS, Montgomery SP, O'Leary DR, Campbell GL 2005. Epidemiology and Transmission Dynamics of West Nile. *Emerg Infect Dis*; 11:1167-1173.
- 12.- Langevin SA, Brault AC, Panella NA, Bowen RA and Komar N 2005. Variation in Virulence of West Nile Virus Strains for House Sparrows (*Passer domesticus*). *Am J Trop Med*; 72:99-102.
- 13.- Brault A, Langevin SA, Bowen RA, Panella NA, Biggerstaff BJ, Miller BR, Komar N 2004. Differential Virulence of West Nile Strains for American Crows. *Emerg Infect Dis*; 10:2161-2168.
- 14.- komar 2001 ??
- 15.- Langevin SA, Bunning M, Davis B and Komar N 2001. Experimental Infection of Chickens as Candidate Sentinels for West Nile Virus. *Emerg Infect Dis*; 7:726-729.
- 16.- Nemeth N, Gould D, Bowen R, Komar N 2006. Natural and Experimental West Nile Virus Infection in Five Raptor Species. *J of Wild Dis*; 42:1-13.
- 17.- Turell MJ, O'Guinn M, Oliver J 2000. Potential for New York Mosquitoes to transmit West Nile Virus. *Am J Trop Med Hyg* 62(3):413-414.