



Universidad Veracruzana

# UNIVERSIDAD VERACRUZANA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

Campus Tuxpan

---

Maestría en Manejo de Ecosistemas Marinos y Costeros

**“Enfermedades infecciosas emergentes (EIE) en Tuxpan,  
Veracruz: los casos de virus del Oeste del Nilo (WNV) y  
malaria aviar en *Leucophaeus atricilla*”**

**TESIS**

**Que para obtener el título de:  
MAESTRO EN MANEJO DE ECOSISTEMAS MARINOS Y  
COSTEROS**

**PRESENTA:  
Elfego Cuevas Domínguez**

**DIRECTOR:  
Dra. Iliana del Carmen Daniel Rentería**

Tuxpan, Veracruz

2013

**M.A. Agustín de Jesús Basáñez Muñoz**

Coordinador de la Maestría

Tuxpan de Rodríguez Cano Veracruz, a 04 de Diciembre de 2013

La presente Tesis titulada **“Enfermedades infecciosas emergentes (EIE) en Tuxpan, Veracruz: los casos de virus del Oeste del Nilo (WNV) y malaria aviar en *Leucophaeus atricilla*”**, realizada por la C. Médico Veterinario Zootecnista Elfego Cuevas Domínguez, bajo la dirección del consejo particular de la Doctora Iliana del Carmen Daniel Rentería, ha sido aprobada y aceptada para poder llevar a cabo la solicitud de fecha de examen para obtener el grado de:

**MAESTRO EN ECOSISTEMAS MARINOS Y COSTEROS**

A handwritten signature in blue ink, consisting of stylized initials and a surname, positioned above a horizontal line.

**DOCTORA ILIANA DEL CARMEN DANIEL RENTERÍA**

DIRECTOR

La presente Tesis titulada “**Enfermedades infecciosas emergentes (EIE) en Tuxpan, Veracruz: los casos de virus del Oeste del Nilo (WNV) y malaria aviar en *Leucophaeus atricilla***”, realizada por el C. MVZ. Elfego Cuevas Domínguez, ha sido aprobada y aceptada para poder llevar a cabo la solicitud de fecha de examen para obtener el grado de:

## MAESTRO EN ECOSISTEMAS MARINOS Y COSTEROS

### COMISIÓN LECTORA:



---

DRA. MARÍA REBECA ROJAS RONQUILLO

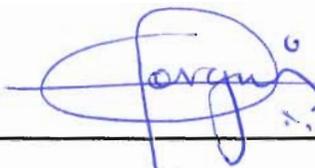
LECTOR



---

DR. RODRIGO CUERVO GONZÁLEZ

LECTOR



---

MTRO. JORDÁN GUTIÉRREZ VIVANCO

LECTOR

Tuxpan de Rodríguez Cano Veracruz, a 04 de Diciembre de 2013.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Iliana del Carmen Daniel Rentería, Directora de esta tesis, gracias por su amistad incondicional y su apoyo para lograr que una idea vaga, poco a poco llegara a concretarse en este trabajo.

Al MVZ. José María Flores Mayorga, por su apoyo y facilidad para procesar las muestras para el diagnóstico de WNV en el laboratorio de bioseguridad nivel III de la de la Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales (CPA).

A la comisión lectora integrada por Dra. María Rebeca Rojas Ronquillo, Dr. Rodrigo Cuervo González y Mtro. Jordán Gutiérrez Vivanco, quienes con su vasta experiencia y acertadas observaciones orientaron a pulir este trabajo.

A los Dr. Jordi Figuerola Borrás y Dr. Josué Martínez de la Puente, Depto. de Ecología de Humedales de la Estación Biológica de Doñana en Sevilla, España, por su apoyo y orientación profesional durante la estancia técnica en el Laboratorio de Ecología Molecular, así como en las aportaciones de información y los comentarios que me ayudaron a enriquecer este trabajo.

Al Dr. Juan Manuel Pech Canché por su apoyo en el análisis estadístico de este trabajo.

Al M.C. Juan Carlos Solís Bautista y al Dr. William Scott Monks Sheets, por las observaciones y sugerencias que me ayudaron a concretar este trabajo.

A mis compañeros, amigos y maestros de posgrado, por su amistad y apoyo en esta etapa de mi formación profesional.

A los amigos que me acompañaron en esta etapa de mi vida; Rubí quien fue confidente y cómplice durante todo este tiempo, el Dr. Pablo quien siempre estuvo al pendiente ofreciendo su apoyo, a Mónica, Lalo, Paty, Liz, Alvaro, Mariana, Martín, Alex, Vale, Juan, Edgar, Luis, Reyna, quienes estuvieron siempre al pendiente y finalmente Everardo a quien jamás terminaré de agradecerle el gesto de nobleza que me brindó para lograr culminar esta etapa de mi vida.

A mis padres, hermanos y sobrinos que siempre nos hemos mantenido como una familia unida a pesar de las distancias.

A mí máxima casa de estudios, la Universidad Veracruzana que una vez más me permite formarme y crecer profesionalmente bajo su respaldo y prestigio académico.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por haberme otorgado la beca (CVU: **414461**) durante 24 meses, a partir del 01 de Agosto del 2011 hasta el 31 de Julio de 2013, para realizar los estudios de maestría, así como la beca mixta para la realización de una estancia durante tres meses en la Estación Biológica de Doñana en Sevilla, España.

## DEDICATORIA

**A mis amores; familia y amigos, por su apoyo  
incondicional.**

*Aquellas personas que llegan y cambian el rumbo de tu vida.*

## ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	7
2.1. VIRUS DEL OESTE DEL NILO (WNV)	8
2.2. PARÁSITOS DE LA MALARIA AVIAR	14
2.3. GAVIOTA REIDORA AMERICANA ( <i>Leucophaeus atricilla</i> )	18
III. OBJETIVOS	23
3.1. GENERAL	23
3.2. ESPECÍFICOS	23
IV. ÁREA DE ESTUDIO	24
V. MATERIALES Y MÉTODOS	27
5.1. FASE DE COLECTA DE MUESTRAS	27
5.1.1. Estaciones de muestreo	27

5.1.2. Captura de aves silvestres por medio de trampas cebadas	28
5.1.2.1. Lazo corredizo	28
5.1.2.2. Modificación de Bal-chatri	29
5.1.2.3. Modificación de Bal-chatri 2	31
5.1.3. Evaluación de la condición general de los individuos	32
5.1.4. Colecta de muestras biológicas	32
5.2. FASE DE LABORATORIO	33
5.2.1. Técnica de ELISA de bloqueo	34
5.2.2 Extendido Sanguíneo (frotis)	36
5.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	38
VI. RESULTADOS	40
6.2. INDIVIDUOS CAPTURADOS	40
6.3. VIRUS DEL OESTE DEL NILO	40

6.4. PRESENCIA DE PARÁSITOS DE LA MALARIA AVIAR	41
6.5. PREVALENCIA DE PARÁSITOS DE LA MALARIA AVIAR	42
VII. DISCUSIÓN	47
7.1. VIRUS DEL OESTE DEL NILO	47
7.2. PARÁSITOS DE LA MALARIA AVIAR	51
VIII. CONCLUSIONES	57
IX. APLICACIONES PRÁCTICAS DEL TRABAJO	58
X. RECOMENDACIONES	60
XI. BIBLIOGRAFÍA	61

## ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
<b>Cuadro 1.</b> Prevalencia de hemoparásitos de la malaria aviar ( <i>Haemoproteus</i> spp., <i>Leucocytozoon</i> spp. y <i>Plasmodium</i> spp.).	39
<b>Cuadro 2.</b> Presencia de hemoparásitos de la malaria aviar por edad en <i>L. atricilla</i> .	41
<b>Cuadro 3.</b> Presencia de hemoparásitos de la malaria aviar por sexo en <i>L. atricilla</i> .	42

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Esquema del ciclo biológico del virus del Oeste del Nilo.	10
<b>Figura 2.</b> Esquema del ciclo de vida de los parásitos de la malaria aviar.	15
<b>Figura 3.</b> <i>Leucophaeus atricilla</i> (gaviota reidora americana).	19
<b>Figura 4.</b> Localización geográfica del municipio de Tuxpan, Veracruz.	24
<b>Figura 5.</b> Hidrología, usos del suelo y servicios en el municipio de Tuxpan, Veracruz.	25
<b>Figura 6.</b> Método del lazo corredizo.	29
<b>Figura 7.</b> Método de Modificación de Bal-chatri 1.	30
<b>Figura 8.</b> Método de Modificación de Bal-chatri 2.	31
<b>Figura 9.</b> Prevalencia de la malaria aviar por edad.	43
<b>Figura 10.</b> Prevalencia de la malaria aviar por sexo.	44
<b>Figura 11.</b> Prevalencia de los hemoparásitos de la malaria aviar por edad en <i>L. atricilla</i> (H: <i>Haemoproteus</i> spp.; L: <i>Leucocytozoon</i> spp.; P: <i>Plasmodium</i> spp.).	45
<b>Figura 12.</b> Prevalencia de malaria aviar por sexo en <i>L. atricilla</i> (H:	46

*Haemoproteus* spp.; L: *Leucocytozoon* spp.; P: *Plasmodium* spp.).

## RESUMEN

Las enfermedades emergentes y reemergentes representan un riesgo tanto para la conservación de la biodiversidad como para los sistemas de salud, ya que la mayoría de estas son zoonóticas, se originan en la fauna silvestre, se transmiten por vectores y son abundantes en las zonas tropicales. Por tales motivos, el objetivo de este estudio fue determinar la presencia y prevalencia de dos enfermedades emergentes: el virus del Oeste del Nilo (WNV) y los parásitos de la malaria aviar (*Plasmodium* spp., *Haemoproteus* spp. y *Leucocytozoon* spp.), en la gaviota reidora americana (*Leucophaeus atricilla*) en Tuxpan, Veracruz. Se capturaron individuos de *Leucophaeus atricilla* (N=57), mediante trampas cebadas de tipo Bal-chatri y sus modificaciones, en zonas próximas al sitio Ramsar 1602. Se tomaron muestras de sangre para la realización de frotis sanguíneos e identificación de los hemoparásitos de la malaria aviar, y suero sanguíneo para realizar técnicas de ELISA de bloqueo e identificar anticuerpos anti-WNV, los resultados se evaluaron mediante análisis estadísticos de Chi-Cuadrada, utilizando el Software R. En este estudio no se encontraron individuos positivos para WNV. Sin embargo, se evidenció la presencia de los hemoparásitos de la malaria aviar con una prevalencia de 43.85%, de estos el que mostró mayor prevalencia de infección fue *Haemoproteus* spp. con 35.09%, seguido de *Leucocytozoon* spp. 7.05% y *Plasmodium* spp. con 1.75%. Las prevalencias fueron similares entre sexos y edades, sin mostrar diferencias estadísticas significativas. Los resultados de este estudio servirán para continuar el monitoreo de las enfermedades emergentes y reemergentes bajo el concepto de medicina de la conservación.

**Palabras clave:** *Leucophaeus atricilla*, virus del Oeste del Nilo, malaria aviar, *Haemoproteus*, *Plasmodium*, *Leucocytozoon*.

## I. INTRODUCCIÓN

Actualmente, el concepto de salud no solo se enfoca a la salud humana sino que engloba la salud pública, la salud animal y la salud de los ecosistemas bajo un solo enfoque (Arrivillaga y Caraballo, 2009). Diversos factores tales como alteraciones ecológicas, sociales y económicos, se relacionan con la aparición y resurgimiento de enfermedades infecciosas cuyos agentes etiológicos resultan desconocidos o se habían aislado sin identificar, denominadas enfermedades infecciosas emergentes (EIE). Las EIE son infecciones nuevas que han aparecido en una población aumentando rápidamente su incidencia y rango geográfico, incluyendo nuevos hospederos; la malaria aviar y el virus del Oeste del Nilo (WNV), son algunos ejemplos. Las enfermedades infecciosas reemergentes (ERE) las cuales involucran patógenos que ya habían sido erradicados o controlados hasta no ser considerados indicadores de alerta epidemiológica y que actualmente han resurgido en regiones geográficas distintas, presentando cambios en su patogenicidad e incidencia, obligando a reestructurar los planes de manejo y control (Suzán *et al.*, 2000; Guzmán *et al.*, 2001; Epstein, 2002; De la Cruz, 2004; Godínez *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2008; Arrivillaga y Caraballo, 2009; Monsalve *et al.*, 2009). El notable aumento en la presentación de EIE y ERE de origen zoonótico conllevó la integración de múltiples disciplinas como la medicina veterinaria, la medicina humana y la salud ambiental, creando un nuevo enfoque de estudio denominada medicina de la conservación, la cual facilita la

comprensión integral y multifactorial de la ecología de estas enfermedades, encaminada al manejo y prevención de las mismas (Koch, 1996; Tabor *et al.*, 2002; Arrivillaga y Caraballo, 2009).

Se ha documentado que del 60-75% de las EIE tienen un origen zoonótico donde el patógeno circula de manera natural en la fauna doméstica y silvestre, poniendo en riesgo al humano al interactuar con estas especies (Jones *et al.*, 2008; Arrivillaga y Caraballo, 2009). La fragmentación del hábitat y las rutas de migración de aves silvestres se relacionan con la aparición y diseminación de EIE en la fauna silvestre (Rappole *et al.*, 2000; Guzmán *et al.*, 2001), y estas pueden funcionar como reservorios, llegando a afectar la supervivencia de las especies nativas, y también la transmisión a las poblaciones humanas por contacto directo o por vectores (Godínez *et al.*, 2006; Monsalve *et al.*, 2009).

La enfermedad del WNV es una EIE, producida por un virus de la familia Flaviviridae, género *flavivirus* (RNAs+), que afecta a un gran número de hospederos (aves, mamíferos, reptiles), durante su ciclo biológico su principal vector son los mosquitos del género *Culex* spp., las aves actúan como amplificadores, transportadores y transmisores de la enfermedad; los equinos, humanos y reptiles son hospederos incidentales (Ramos y Falcón, 2004; Farfán-Ale *et al.*, 2006; Ciuoderis-Aponte, 2009), esta enfermedad se ha propagado por

distintas regiones a nivel mundial, atribuyéndose la dispersión principalmente a la migración de aves (Dusek *et al.*, 2009; Reisen *et al.*, 2010).

La malaria aviar es otra EIE, la cual en sentido amplio involucra a tres géneros de parásitos (*Plasmodium* spp., *Haemoproteus* spp. y *Leucocytozoon* spp.), los cuales comprenden un diversos grupos de hemoparásitos que infectan las células sanguíneas; estos parásitos afectan una gran cantidad de especies de vertebrados incluyendo reptiles, anfibios, aves y mamíferos (Van Riper, 1991; Atkinson *et al.*, 2001). Dichos parásitos sanguíneos son transmitidos por vectores y sus implicaciones en la salud de las aves siguen siendo foco de investigación y debate (Martínez, 2008). Las especies de *Plasmodium* spp. y *Leucocytozoon* spp. son comúnmente transmitidas por mosquitos culícidos, mientras que *Haemoproteus* spp. es transmitido principalmente por *Culicoides* (Valkiūnas, 2005). Se ha documentado en diversas especies de aves silvestres que estos parásitos presentan una alta prevalencia y diversidad genética (Hasselquist *et al.*, 2007; Krone *et al.*, 2008; Knowles *et al.*, 2011).

Las aves son utilizadas comúnmente para evaluar el estado de salud de los ecosistemas debido a que se consideran buenos indicadores de los cambios ambientales de las zonas más importantes para la conservación de otros grupos taxonómicos (Godínez *et al.*, 2006), sin embargo, estos acontecimientos son

cuestionables, debido a que existen una gran cantidad de factores que determinan el estado de salud de un hábitat y un aumento en el número de algunas especies de aves puede indicar un empeoramiento del estado de salud ambiental de un humedal (Green y Figuerola, 2003). El estudio de las poblaciones de especies indicadoras es de gran importancia, pues proveen información oportuna de los posibles daños a la salud pública, la salud animal y salud de los ecosistemas (Godínez *et al.*, 2006; Monsalve *et al.*, 2009). Las manifestaciones más frecuentes que presentan los individuos son el incremento en la presentación y diseminación de enfermedades infecciosas y no infecciosas (virales, bacterianas, parasitarias), que pueden afectar la salud reproductiva y la respuesta inmunológica (Godínez *et al.*, 2006). Las especies locales pueden ser más sensibles a los cambios ambientales, debido a que se encuentran sujetas a las mismas condiciones durante todo el año, pudiendo reflejarlos en la salud de los individuos, en las poblaciones y en los ecosistemas (González *et al.*, 2003; Godínez *et al.*, 2006).

Las aves habitan diversos ecosistemas y se ha observado que los humedales costeros son de los preferidos por estas, debido a que ocupan un lugar privilegiado por la riqueza natural que encierran y los servicios ambientales que prestan; son ecosistemas que sirven de arribo, zonas de descanso, alimentación, invernación y reproducción de una gran cantidad de especies de aves migratorias y residentes (CONABIO, 2008). La zona costera del Golfo de México geográficamente marca el sitio de transición de dos regiones biogeográficas la

neártica y la neotropical, lo cual hace que la zona presente ambientes complejos que acogen mayor biodiversidad (Gallardo *et al.*, 2004; CONABIO, 2008). No resulta extraño que en esta zona concurren las cuatro rutas migratorias de aves de América del Norte y la migración más grande de aves rapaces en el mundo (Rappole *et al.*, 2000; Gallardo *et al.*, 2004; Ruelas, 2006; CONABIO, 2008). Para el Golfo de México se han detectado 231 especies de aves, de las cuales el 44% son acuáticas, el 29% terrestres y el 27% marinas; esta avifauna representa el 22% de las aves reconocidas para México (Gallardo *et al.*, 2004); además se caracteriza por una marcada estacionalidad, el 45% son visitantes de invierno, el 33% son especies residentes, el 10% son transitorios y 10% son accidentales (Gallardo *et al.*, 2004; Ruelas, 2006).

La avifauna reportada para Tuxpan, Veracruz (sitio Ramsar 1602: “Manglares y Humedales de Tuxpan”) es de 111 especies de las cuales 71.2% son residentes, 23.4% son visitantes de invierno, 1.8% accidentales y el resto presenta un estatus cuestionable (Hernández, 2010). La gaviota reidora (*Leucophaeus atricilla*) es un ave marina común en México, no presenta problemas de conservación y muestra una gran abundancia en la zona costera del norte de Veracruz, debido a que se asocia a ambientes altamente perturbados en los cuales se desarrollan actividades antropogénicas, siendo la pesca la actividad que atrae a muchos individuos de esta especie (Hernández, 2010).

En Tuxpan, Veracruz se presentan las condiciones idóneas para el desarrollo de EIE (baja inmunidad en hospederos, abundancia de especies vectores, hospederos y condiciones climatológicas favorables). Considerando lo anterior, el objetivo de este trabajo consiste en evaluar la presencia y prevalencia de dos EIE, los parásitos de la malaria aviar y el WNV, abriendo las posibilidades de realizar estudios más específicos sobre las interacciones entre parásitos, vectores y hospederos de estas EIE de gran importancia para la salud pública, salud animal y la salud ecosistémica.

## II. ANTECEDENTES

En Tuxpan, Veracruz no existe información sobre el estatus zoonosanitario de las aves silvestres e incluso la información existente solo nos permite tener datos sobre distribución y abundancia absoluta o relativa de las aves presentes en el sitio Ramsar 1602: Manglares y Humedales de Tuxpan (Hernández, 2010), es de gran importancia obtener estos datos sobre el estado de salud de los individuos para conocer cuáles son los principales patógenos que pudieran afectar la salud poblacional o las enfermedades zoonóticas de importancia a la salud pública (Suzán *et al.*, 2000; Gallardo *et al.*, 2004). El uso de las aves como bioindicadoras de cambios ambientales se fundamenta en que debido a su posición en la escala trófica se verán afectados por una gran variedad de factores. El uso de especies bioindicadoras implica su monitoreo y su uso para formular planes de manejo de los recursos naturales (González *et al.*, 2003).

Durante la migración hacia el sureste de los Estados Unidos, México, América central, las islas del Caribe y América del Sur; México recibe gran cantidad de aves en busca de lugares óptimos para su reproducción, busca de alimento, anidación o simplemente para refugiarse durante el invierno, éstas se reúnen en distintos humedales como los sistemas estuarinos, lagunares y manglares del Golfo de México, los cuales son de gran importancia para aves acuáticas

migratorias y residentes que dependen de estos ecosistemas (Howell y Webb, 1995; Gallardo *et al.*, 2004; Ruelas, 2006; CONABIO, 2008).

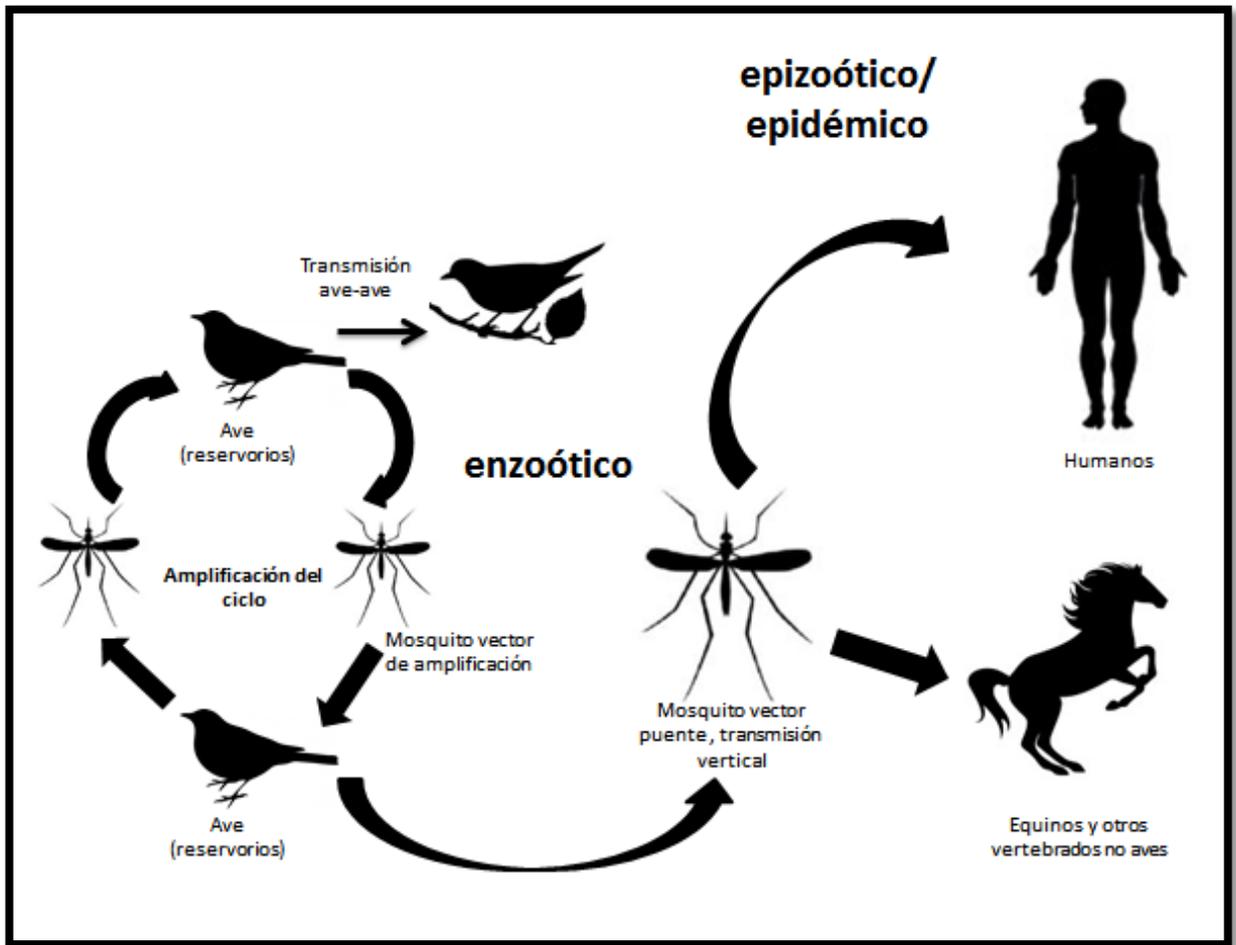
En los últimos años la presencia de enfermedades infecciosas ha causado reducciones en las poblaciones de especies silvestres, entre ellas brotes de morbillivirus en cetáceos, parvovirus en leones, distemper de las focas, fibropapilomatosis de las tortugas, mortalidad de cuervos y otras aves por WNV, etc. (Dazak y Cunningham, 2002; Godínez, 2006; Medina-Voguel, 2010).

## **2.1. VIRUS DEL OESTE DEL NILO (WNV)**

El virus del Oeste del Nilo (WNV, por sus siglas en inglés) pertenece a la familia Flaviviridae género *Flavivirus*, el cual incluye otros arbovirus, tales como el dengue, la fiebre amarilla, el virus de la encefalitis de San Luis, el virus de la encefalitis Japonesa, entre otros (Rossi *et al.*, 2010). Es una partícula esférica de aproximadamente 50 nm de diámetro, la nucleocápside contiene RNA de una sola hebra de sentido positivo y de aproximadamente 11,000 nucleótidos, que codifica tres proteínas estructurales (cápside, membrana y envoltura) y siete proteínas no estructurales (Berrocal *et al.*, 2006). El análisis filogenético basado en la secuencia del genoma del virus muestra que hay dos linajes distintos: el linaje 1 el cual causa

enfermedad en humanos y se extiende en Europa y América; el linaje 2 que se encuentra solo en África subsahariana y no ocasiona enfermedades en humanos (Berrocal *et al.*, 2006; Goodman y Cuningham, 2007).

El ciclo biológico del WNV se mantiene en la naturaleza en un ciclo enzoótico ave-mosquito-ave, en donde los mosquitos son los vectores, las aves funcionan como amplificadores primarios y reservorios del virus y finalmente los equinos, humanos y otros vertebrados son hospederos incidentales que no son capaces de amplificar el virus pero si manifestar la enfermedad (figura 1) (Berrocal *et al.*, 2006; Fernández-Salas *et al.*, 2007; Murray *et al.*, 2010).



**Figura 1.** Esquema de ciclo biológico del virus del Oeste del Nilo. Modificado de Murray *et al.*, 2010.

Los mosquitos culícidos (*Culex* spp.) son considerados los vectores más importantes del WNV, sin embargo se ha aislado el virus en 48 especies de mosquitos a nivel mundial, en México *Cx. p.pipiens*, *Cx. p.quinquefasciatus* y *Cx. tarsalis*, y los híbridos de *Cx. p. pipiens* y *Cx. p. quinquefasciatus* son los

principales vectores que se han reportado (Reyes-Villanueva *et al.*, 2006; Díaz-Badillo *et al.*, 2011).

En las aves se ha identificado al WNV en al menos 300 especies incluyendo migratorias, residentes y domésticas de las cuales las que han mostrado mayor mortalidad son las del Orden Passeriformes, siendo los miembros de la Familia Corvidae los más afectados (Medica *et al.*, 2007; Goodman y Cuningham, 2007). Los cuervos americanos (*Corvus brachyrhynchos*) son la especie que ha mostrado mayor susceptibilidad al WNV, en estas aves ha provocado mortalidades epizooticas en Estados Unidos, otras especies que han mostrado susceptibilidad son gansos (*Anser spp.*), halcones (*Falco spp.*) y arrendajos (*Garrulus glandarius*), sin embargo, cualquier especie que tenga contacto con el virus puede mostrar anticuerpos y/o funcionar como reservorio de la enfermedad (Stele *et al.*, 2000; Ziegler *et al.*, 2010).

En mamíferos la presencia de WNV se ha reportado al menos en 18 especies, donde se incluyen frecuentemente a los humanos, equinos pero también se ha diagnosticado en ardillas, gatos, perros, ovinos, conejos, murciélagos y lobos marinos. También se ha detectado en reptiles: cocodrilos, tortugas y caimanes (Ramos y Falcón, 2004; Goodman y Cunningham, 2007).

En humanos la mayoría de los individuos infectados (80%) no desarrolla síntomas, el 20% puede presentar una fiebre similar a otras fiebres virales, como el virus de la influenza y el virus del dengue y solo el 1% desarrolla síntomas neurológicos variables que van desde una rigidez cervical, somnolencia y desorientación hasta una parálisis flácida, convulsiones, meningoencefalitis, coma y muerte (Ramos y Falcón, 2004; Fernández-Salas, 2007).

Para el diagnóstico de WNV se utilizan técnicas serológicas y moleculares, la serología se basa en la identificación de anticuerpos IgG e IgM por medio de técnicas de ensayo inmunoenzimático (ELISA) de captura en humanos y ELISA bloqueo en aves y equinos, a partir de muestras de suero y líquido cefalorraquídeo (LCR); en mamíferos la detección de anticuerpos IgM en LCR junto con los hallazgos clínicos confirman el diagnóstico de WNV, sin embargo, existe la desventaja que se pueden presentar reacciones cruzadas con otras enfermedades producidas por *Flavivirus*. La prueba de neutralización de la reducción de placas (PRNT) se utiliza para verificar las pruebas positivas a la técnica de ELISA de bloqueo en aves y equinos, también se recurre al uso de técnicas específicas para la identificación de proteínas virales como la reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa (RT-PCR) (Ramos y Falcón, 2004; Morales-Bertoulle, 2005; Fernández-Salas, 2007).

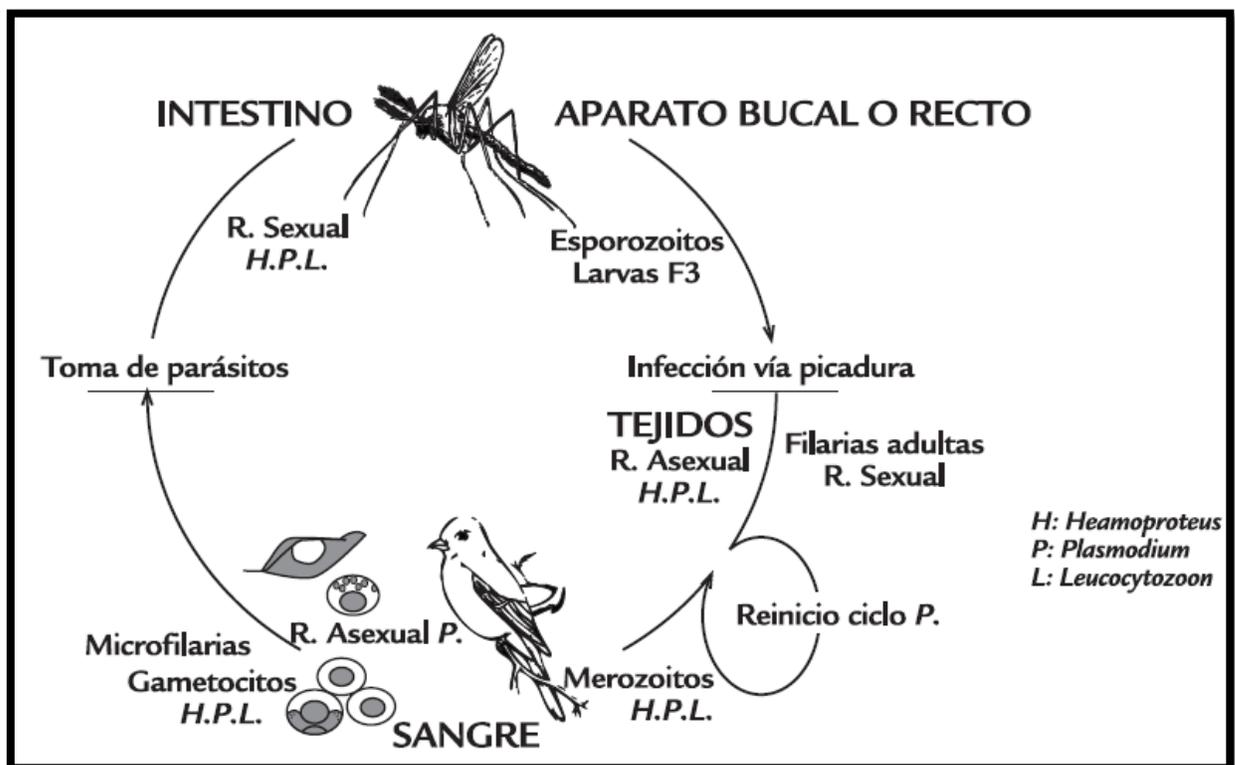
El virus del Oeste del Nilo se identificó por primera vez en el Distrito del Oeste del Nilo en Uganda en 1937, posteriormente se presentaron nuevas epidemias en Israel en 1957, en 1962 en Francia y desde entonces se han notificado brotes en África, Europa, Asia, la cuenca del Mediterráneo y medio Oriente (Berrocal *et al.*, 2006). En el continente americano el WNV fue aislado por primera vez en Nueva York en 1999, que coincidió con brotes en cuervos y otras aves exóticas presentando una elevada tasa de mortalidad (Fernández-Salas *et al.*, 2007). Actualmente el virus se ha propagado en gran parte de Estados Unidos con más de 30,000 casos reportados (en humanos), de los cuales más de 1,200 han sido mortales (Díaz-Badillo *et al.*, 2011). En Suramérica a partir de 2002 se determinó evidencia de transmisión en Jamaica, Puerto Rico, y en los siguientes años se ha diagnosticado en Islas Caimán, Jamaica, Republica Dominicana, Cuba, Puerto Rico, El Salvador y Colombia (Dupuis *et al.*, 2003; Berrocal *et al.*, 2006; Monsalve *et al.*, 2009). En México en el 2002 se diagnosticaron aves migratorias y residentes y equinos con serología positiva en Yucatán y Coahuila (Dupuis *et al.*, 2003). Farfán-Ale *et al.*, (2006) menciona la presencia de anticuerpos anti-WNV en mamíferos, aves y reptiles de la península de Yucatán, los cuales eran asintomáticos a la enfermedad. Para el municipio de Tuxpan, Veracruz, Rodríguez, (2012) reportó la presencia de anticuerpos anti-WNV en equinos.

## 2.2. PARÁSITOS DE LA MALARIA AVIAR

Los haemosporidios de la malaria aviar son un grupo de protistas heteroxenos que requieren de la intervención de insectos dípteros hematófagos como vectores para su transmisión (Valkiūnas, 2005). Este grupo engloba diferentes familias de parásitos como Plasmodiidae, Haemoproteidae, Leucocytozoidae y Garniidae que afectan una gran cantidad de especies de vertebrados incluyendo reptiles, anfibios, aves y mamíferos (Van Riper, 1991; Atkinson *et al.*, 2001). Adquieren gran importancia en la salud pública al ser zoonóticas algunas especies de estos géneros.

El ciclo biológico de los parásitos de la malaria aviar incluye fases de reproducción sexual y asexual, en las que se involucra un hospedero invertebrado (vector) y un hospedero vertebrado (ave) (Matta y Rodríguez, 2001). En general, el parásito se transmite al hospedador vertebrado en forma de esporozoito mediante la picadura de un insecto vector. Posteriormente, el parásito desarrolla una fase de reproducción asexual en los tejidos internos del hospedador, donde los merozoitos resultantes invadirán los eritrocitos (glóbulos rojos), del torrente circulatorio del hospedador. Ahí, los parásitos continuarán desarrollándose en forma de gametocitos (precursores de gametos) o merontes (esquizontes). Cuando el insecto que actúa como vector consume la sangre de su hospedador ingiere los

gametocitos parásitos, formas que posteriormente se desarrollarán en el tubo digestivo del vector en microgametos (machos) y macrogametos (hembra) dando lugar a la reproducción sexual del parásito. La unión de estos gametos formará el cigoto, que se diferenciará en un oocineto y, tras penetrar el tubo digestivo del vector, se dividirá mediante reproducción asexual (esporogonia) dando lugar a los esporozoitos. Estas últimas fases representan las formas infectivas del parásito que migrarán a las glándulas salivares del vector para introducirse en un nuevo hospedador vertebrado con la picadura del insecto (figura 2), completando así el ciclo vital (Matta y Rodríguez, 2001; Valkiūnas, 2005; Quiroz, 2005).



**Figura 2.** Esquema del ciclo de vida de los parásitos de la malaria aviar. Matta y Rodríguez, 2001.

Sin embargo el ciclo biológico de los haemosporidios presenta diferencias entre los distintos géneros que engloba. En el caso de *Plasmodium*, los eritrocitos del hospedador son susceptibles a ser parasitados por esquizontes y gametocitos, mientras que en *Haemoproteus* spp. y *Leucocytozoon* spp., sólo los gametocitos infectan los eritrocitos del hospedador (Matta y Rodríguez, 2001; Valkiūnas, 2005).

Además, existen diferencias en cuanto a las especies de insectos que son susceptibles de transmitir cada una de estas especies de parásitos sanguíneos (Martínez, 2008). Los insectos del género *Culicoides* (Ceratopogonidae) y los hipobóscidos (Hippobosciidae) son los principales vectores de *Haemoproteus* spp., los culícidos (Culicidae) de *Plasmodium* spp. y los simúlidos (Simuliidae) de *Leucocytozoon* spp. (Valkiūnas, 2005). Debido a las diferencias encontradas en el ciclo biológico y los vectores involucrados en la transmisión de los diferentes géneros de haemosporidios, algunos autores sugieren restringir el término malaria exclusivamente a aquellas enfermedades fruto de infecciones producidas por parásitos del género *Plasmodium* spp., excluyendo del término las infecciones producidas por los géneros *Haemoproteus* spp. y *Leucocytozoon* spp. (Martínez, 2008). Sin embargo, existe una marcada controversia en cuanto al empleo de esta terminología (Pérez-Tris *et al.*, 2005), debido al estrecho parentesco filogenético entre estos géneros, lo que apoyaría la inclusión de todos ellos como parásitos de la malaria aviar.

Los estudios de los hemoparásitos aviares, tradicionalmente se realiza con extendidos de sangre periférica (frotis), que permiten observar características morfológicas del parásito, estimación de la parasitemia y también algunos hallazgos hematológicos como forma de las células sanguíneas. Sin embargo, estos métodos son subestimados por algunos autores (Lotta, 2010). A partir del desarrollo de técnicas de diagnóstico molecular de los parásitos de la malaria aviar, cada vez toman mayor importancia para ser usados como modelos ecológicos y evolutivos en las interacciones hospedero-parásito (Bensch *et al.*, 2009; Knowles *et al.*, 2011). Además con la aplicación de estas técnicas moleculares se pueden diagnosticar de manera simultánea *Plasmodium* spp.-*Haemoproteus* spp. y *Leucocytozoon* spp. (Hellgren *et al.*, 2004). Estos parásitos se han documentado en diversas especies de aves silvestres con alta prevalencia y diversidad genética (Hasselquist *et al.*, 2007; Krone *et al.*, 2008; Knowles *et al.*, 2011).

La prevalencia y parasitemia puede variar debido a diversos factores biológicos o ambientales, tales como la edad de los hospedadores, especie, estadio reproductivo, disponibilidad de comida, altitud, distancia de zonas boscosas (Knowles *et al.*, 2011; Quillfeldt *et al.*, 2011). Sus implicaciones en la salud de las aves siguen siendo foco de investigación y debate. No obstante, estos parásitos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, donde como en el caso

de las aves, pueden llegar a infectar al 70% de las especies examinadas (Van Ripper, 1991; Atkinson *et al.*, 2001).

### **2.3. GAVIOTA REIDORA AMERICANA (*Leucophaeus atricilla*)**

Las gaviotas se distribuyen por todo el mundo, más comúnmente en las regiones templadas, los números de varias especies han aumentado considerablemente en los últimos años pero algunas poblaciones de este crecimiento han cesado e incluso disminuyeron sus poblaciones, debido a la disponibilidad de alimento que está estrechamente relacionada a actividades antropogénicas, principalmente las pesqueras (Cantos, 2009).

La gaviota reidora americana *L. atricilla* (Linnaeus, 1758) es un ave marina perteneciente al orden Charadriiforme de la familia Laridae, se caracteriza por ser robusta, con excelente vuelo, presenta la cabeza negra durante la época de reproducción y la espalda y alas oscuras con las puntas negras. En invierno la cabeza es blanca con una mancha negra detrás de la oreja. Mide aproximadamente 40 cm de longitud de la punta del pico a la extremidad de la cola (figura 3). El juvenil es de color café con la rabadilla blanca. Su vocalización es distintiva, generalmente similar a una risa. Los juveniles presentan una risa estridente o chillona. Habita en puertos, playas, estuarios, lagunas, ríos, lagos,

etc., la mayoría de las gaviotas anida en las regiones templadas, construyendo sus nidos principalmente en las marismas y ponen de dos a cuatro huevos. Esta especie anida localmente en la costa del Pacífico y en Yucatán, y en invierno es más ampliamente distribuida en ambas costas, además de distribuirse por el Golfo de México hasta las costas de Florida (Howell y Webb, 1995; Ceballos-Lascurráin *et al.*, 2000; Schreiber, 2002).



**Figura 3.** *Leucophaeus atricilla* (gaviota reidora americana). Original de Juan Cipriano Anastasio, 2012.

La gaviota reidora es una especie común en México, en el sitio Ramsar 1602, es una de las especies más abundantes (Hernández, 2010), no presenta problemas de conservación, se caracterizan por presentar hábitos de alimentación oportunista y generalista, y depende de muchas fuentes de origen antrópico (basuras y descartes pesqueros) (Silva *et al.*, 2000), ocupando una gran cantidad de hábitats fragmentados, interactuando con otras especies de aves y con las poblaciones humanas, por lo cual, se puede evaluar la presencia de algunos patógenos zoonóticos que pudieran transmitir a la población y a otras especies de aves, además se les considera un buen indicador de las concentraciones de contaminantes en el ambiente marino (Muñoz *et al.*, 2003; Pérez, 2009).

Se han utilizado a las gaviotas como indicadoras de la presencia de altas concentraciones de metales pesados en el ambiente, los desechos industriales pueden afectar la salud de los ecosistemas, la salud del individuo e incluso la muerte (Burger y Gochfeld, 2002; Cortés y Luna-Jorquera, 2011). También se han utilizado las señales sexuales que presentan las gaviotas como indicadoras de la salud ambiental, mostrando una disminución de su expresión cuando se encuentran expuestas a contaminantes (Pérez, 2009).

En cuanto a hábitos alimenticios se sabe que las alteraciones climáticas influyen sobre la distribución y abundancia de las presas de las aves marinas manifestando

efectos directos sobre el peso y la tasa de crecimiento de éstas (Schreiber, 2002). Debido a los hábitos alimenticios oportunistas, se han presentado muertes epidémicas por Aspergilosis en *Larus argentatus* (Rosiles *et al.*, 2000); el botulismo es otra enfermedad que se ha presentado debido a la alimentación en los basureros (Cantos, 2009). Además de que pueden diseminar bacterias como *Campylobacter* y *Salmonella*; protozoarios entéricos y ectoparásitos.

La fragmentación del hábitat de las aves, por parte del hombre, genera mayor interacción entre ellos. Las aves causan pérdidas en actividades como la agricultura y la acuicultura. La acuicultura se ve afectada porque además de comerse a los peces, les causan estrés, retrasan su crecimiento y les transmiten varias enfermedades con sus patas o plumaje, por ejemplo, bacterianas: nemátodos, tremátodos, entre otros microorganismos (Contreras *et al.*, 2003). Además de que pueden afectar a la salud pública por la diseminación de enfermedades zoonóticas.

La conservación de los ecosistemas y la biodiversidad a partir de enfoques multidisciplinarios puede dar mejores resultados a la hora de crear planes de manejo (Arrivillaga y Caraballo, 2009). Se trata de involucrar a expertos en distintas disciplinas para atender las enfermedades emergentes y reemergentes en donde se manejen aspectos de salud animal, salud humana y la ecología de las poblaciones bajo la premisa que los individuos, las poblaciones y las especies

constituyen un conjunto indivisible (Tabor *et al.*, 2002). La medicina de la conservación es una ciencia multidisciplinaria (Rapport, 1995) que describe mejor la forma de mantener la “salud de los ecosistemas” al estudiar las interacciones entre patógenos y enfermedades por un lado y las especies y los ecosistemas por el otro, enfocando sus esfuerzos en la remediación de problemas de “salud ecológica” (Tabor *et al.*, 2002; Arrivillaga y Caraballo, 2009).

### III. OBJETIVOS

#### 3.1 GENERAL

Evaluar la presencia de dos enfermedades emergentes en la gaviota reidora americana (*Leucophaeus atricilla*): virus del Oeste del Nilo (WNV) y parásitos de la malaria aviar (*Plasmodium* spp., *Haemoproteus* spp. y *Leucocytozoon* spp.).

#### 3.2 ESPECÍFICOS

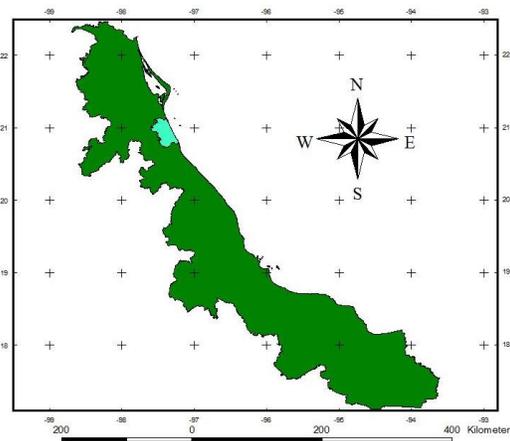
Determinar la presencia y prevalencia de anticuerpos contra la enfermedad del virus del Oeste del Nilo (WNV) en *Leucophaeus atricilla*.

Determinar la presencia y prevalencia de los parásitos de la malaria aviar (*Plasmodium* spp., *Haemoproteus* spp. y *Leucocytozoon* spp.) en *Leucophaeus atricilla*.

## IV. ÁREA DE ESTUDIO

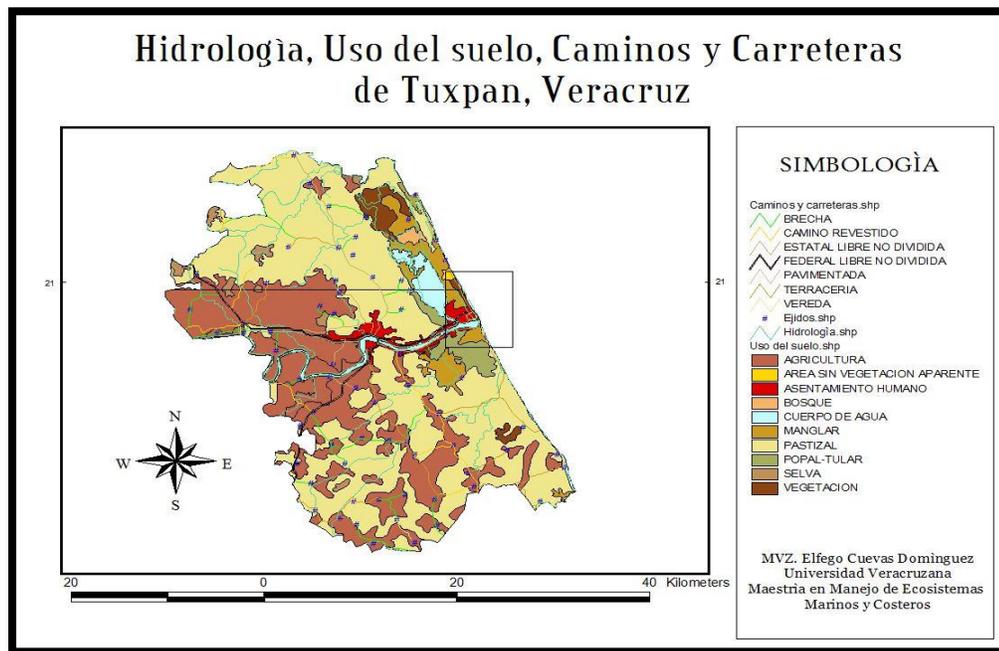
El trabajo se llevó a cabo en el municipio de Tuxpan, Veracruz, el cual se localiza en la zona norte del estado, sus coordenadas geográficas son: entre los paralelos 20° 44' y 21° 09' de latitud norte; los meridianos 97° 13' y 97° 36' de longitud oeste (figura 4). Colinda al norte con el Golfo de México y con los municipios de Tamiahua y Álamo-Temapache; al este con el Golfo de México y el Municipio de Cazones de Herrera; al sur con los municipios Cazones de Herrera y Tihuatlán; al oeste con los municipios de Tihuatlán y Álamo-Temapache (INEGI, 2001).

Macrolocalización de Tuxpan, Veracruz



**Figura 4.** Localización geográfica del municipio de Tuxpan, Veracruz.

La captura de las aves se llevó a cabo en zonas próximas a la laguna de Tampamachoco en la Colonia La Mata y en playas de Tuxpan, Veracruz, las cuales son zonas aledañas al sitio Ramsar 1602: “Manglares y Humedales de Tuxpan” que forma parte de la Región Terrestre Prioritaria (RTP-103) para la Conservación de México, y el cual está integrado por el sistema lagunar “laguna de Tampamachoco” y el Sistema estuarino “estero de Tumilco”. Las principales actividades que se llevan a cabo en el área de estudio son la pesca artesanal y ribereña y la vegetación predominante son las especies de mangle; *Rizophora mangle* (mangle rojo), *Laguncularia racemosa* (mangle blanco), *Avicennia germinans* (mangle negro), *Conocarpus erectus* (Botoncillo) (INEGI, 2001) (figura 5).



**Figura 5.** Hidrología, usos del suelo y servicios en el municipio de Tuxpan, Veracruz.

El clima predominante es el cálido húmedo, también llamado tropical y se caracteriza por la presencia de temperaturas elevadas durante todo el año y abundantes lluvias, las características que se presentan en la zona son: una temperatura media anual de 24.9° C, siendo enero el mes más frío con 19.9° C promedio y junio el más caluroso con un promedio de 28.3° C. La precipitación total anual es de 1 341.7 mm, presentando la estación seca de noviembre a mayo y la lluviosa de junio a octubre. El mes más seco es enero con 33 mm y el más lluvioso, julio con 175.7 mm (INEGI, 2001).

## **V. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. FASE DE COLECTA DE MUESTRAS**

Esta etapa del estudio incluyó la captura de aves mediante trampas cebadas, las cuales fueron usadas de acuerdo a la eficiencia de captura que se observó, resulta importante mencionar que en este estudio también se utilizaron individuos capturados accidentalmente por pescadores de la zona, en este apartado también se incluye la toma de muestras biológicas y características morfológicas para determinación de sexo y edad.

#### **5.1.1. Estaciones de muestreo**

Las muestras se recolectaron durante dos periodos, de marzo-noviembre de 2012 y febrero-abril de 2013, durante estos meses se capturaron mediante trampas cebadas a los individuos de poblaciones de *Leucophaeus atricilla* y se tomaron las recomendación para la utilización de las aves silvestres en investigación de Fair *et al.*, (2010).

### **5.1.2. Captura de aves silvestres por medio de trampas cebadas**

Para llevar a cabo las capturas de aves silvestres se solicitó un permiso de colecta científica emitido por la SEMARNAT (OFICIO NÚM SGPA/DGVS 00957/12).

Para las trampas se utilizaron vísceras de pescado como cebo para atraer a las gaviotas, los cuales se consiguieron en las cooperativas y con los pescadores del área de estudio.

#### **5.1.2.1. Lazo corredizo**

Consiste en un hilo de polipropileno de 15 m (1mm de grosor) con una apertura corrediza de 10 a 15 cm de diámetro. La apertura se localiza de 10 a 15 m del operador. El área donde se encuentra la apertura del lazo fue cebada y una vez que la gaviota pisa el centro del lazo, se jala rápidamente para capturarla por una de sus patas (González-Acuña *et al.*, 2010).



**Figura 6.** Método del lazo corredizo.

#### **5.1.2.2. Modificación de Bal-chatri**

Esta se basa en la trampa descrita por Berger y Mueller, (1959), para aves rapaces. Los materiales que se utilizan son botellas de plástico de 2 litros llenas de agua o arena, hilo de nylon transparente y azul petróleo (grosor=0.35 mm) y clavos metálicos de 6 pulgadas. La botella se entierra en posición vertical, Aprox. 20 cm bajo la arena. La cual cumple la función de ancla y plataforma. Al cuello de la botella se ata un mínimo de 7 cabos de hilo de nylon (longitud=70-80 cm) a los cuales se ata un clavo en sus extremo libre. Los clavos se entierran en la arena siguiendo una distribución radial con respecto al cuello de la botella. A cada clavos

se anudan de 5 a 8 lazos corredizos (diámetro=10 cm) de hilo de nylon ajustados a una distancia de 10-30 cm desde el clavo. Los lazos se distribuyen radialmente con respecto al clavo procurando cubrir el mayor espacio posible. Todos los hilos se cubren con arena o algas, dejando una parte del lazo sobresaliente y levantado, con el propósito de que las aves sean lazadas de sus patas cuando sean atraídas por el cebo. Esta trampa se utiliza mejor en la playa (González-Acuña *et al.*, 2010).



**Figura 7.** Método de Modificación de Bal-chatri 1.

### 5.1.2.3. Modificación de Bal-chatri 2

Esta consiste en una modificación de la anterior, la cual consiste en un aro de manguera de  $\frac{1}{4}$  de pulgada, la cual fijada con hilos de nylon de un lado al otro, a manera de entrelazar con hilos el aro y posteriormente a estos hilos se anudan más cabos (diámetro=10 cm) a manera que sean corredizos, al aro de manguera se ceba con vísceras, se sujeta con un hilo de polipropileno y se pone a flotar, con el propósito de que las aves sean atraídas y a la hora de agarrar el cebo sean lazadas de las patas. Otra trampa, modificación de la anterior, fue construida con varilla de metal de 50 cm, se soldaron formando un cuadrado de 50 x 50 cm y se colocaron 2 barras paralelas de cada lado soldadas en el centro, quedando como una malla, a esta se anudan cabos de nylon al igual que los mencionados anteriormente, la ventaja de esta es que se puede colocar en cualquier superficie camuflajeandola con materiales del entorno.



**Figura 8.** Método de Modificación de Bal-chatri 2.

Para su manejo las aves capturadas se colocarán temporalmente en bolsas de tela de algodón suave y delgado, para disminuir el estrés.

### **5.1.3. Evaluación de la condición general de los individuos**

De cada ave capturada se evaluaron la edad y sexo mediante características morfológicas (talla, coloración de plumas), clasificándolas en juveniles y adultos; machos, hembras y sin identificación para organismos juveniles, respectivamente (Howell y Webb, 1995; Ceballos-Lascurraín *et al.*, 2000; Schreiber, 2002).

### **5.1.4. Colecta de muestras biológicas**

Mediante venopunción se recolectaron muestras de sangre y suero, a partir de las venas yugular, tibiotarsal y ulnar, utilizando jeringas de 1 mL, graduadas de 0 a 100 unidades con aguja calibre 27 y/o 29 G con de longitud 13 mm (Fair *et al.*, 2010). Las muestras de sangre se colocan en tubos de ensayo con y sin anticoagulante etilen diamino tetraacético (EDTA), de las cuales, la que no contiene anticoagulante posteriormente se centrifugará a 3000 rpm por 10 minutos para obtener suero, el cual se colocó en tubos eppendorf de 1.5 mL, se identifica el número de muestra y se conserva a temperatura de 2 a 5 °C, posteriormente

mediante técnicas de ensayo inmunoenzimático (ELISA) de bloqueo se identifica la presencia de anticuerpos anti-WNV, en el laboratorio de bioseguridad nivel III de la Comisión México-Estados Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales (CPA) (CENAVECE, 2012). La muestra con anticoagulante EDTA se utiliza para realizar frotis para el diagnóstico de parásitos de la malaria aviar.

Las muestras se colocan en una hielera con refrigerantes para su transporte al laboratorio. Se deben conservar en refrigeración para su posterior procesamiento (CENAVECE, 2012).

## **5.2. FASE DE LABORATORIO**

El procedimiento para realizar el procesamiento de las muestras consiste en realizar la técnica de ELISA de bloqueo para la identificación de anticuerpos contra el WNV, frotis de cada muestra de sangre para evaluar hemoparásitos.

### 5.2.2 Técnica de ELISA de bloqueo

Las técnicas de diagnóstico de ELISA de bloqueo se realizaron en el laboratorio de bioseguridad nivel III de la CPA, con dirección km.15.5 carretera México-Toluca, Palo Alto, Delegación Cuajimalpa, C.P. 05110, México D.F. La técnica de ELISA de bloqueo se lleva a cabo a partir del suero obtenido en las muestras mediante el protocolo de Hall *et al.*, (1995).

Los pozos de una microplaca (Immulon 2HB, Dynex Technologies, Chantilly, VA, EE.UU), según indicaciones del fabricante, se cubren con 100  $\mu$ l de antígeno diluido en amortiguador de bicarbonato de sodio (50 mM de bicarbonato de sodio, pH de 9.6) y se utiliza como antígeno control el sobrenadante de un cultivo celular no infectado.

Estas placas se incuban toda la noche a 4°C y después se lavan con 250  $\mu$ l de amortiguador de lavado PBS-T (Phosphate Buffered Saline-Tween 20).

Se agrega a cada pozo 200  $\mu$ L de amortiguador bloqueador (PBS con 5 % de leche en polvo descremada y se incuba por 40 minutos a 37°C. Después se

añaden 50 µL de suero de ave diluido (1:10) a cada pozo y se incuban por dos horas a 37° C. Posteriormente se lavan los pozos seis veces más con 250 µL de amortiguador de lavado.

Se incuban los pozos con anticuerpo monoclonal contra la proteína NS1 (3.1112G), diluido en amortiguador bloqueador (1:2 000) y se agregan a cada pozo (50 µL). Después se incuban los pozos por una hora a 37°C. Las placas se lavan y se añade 50 µL de peroxidasa de rábano conjugada con IgG antiratón preparada en conejo, a una dilución 1:2 000 en cada pozo y otra vez se incuba por una hora a 37°C. Se vuelven a lavar los pozos seis veces con amortiguador de lavado. Se mezclan volúmenes iguales de ABTS (ácido 2,2'-azino-di-[3-etil-benzotiazolina]-6-sulfónico) y soluciones de peroxidasa del sistema de sustrato peroxidasa y de esta solución se toman 75 µL que se añaden a cada pozo.

La densidad óptica (DO) a una longitud de onda de 415 nm se determina mediante un lector automático de placas (Benchmark Microplate Reader de Bio-Rad). El porcentaje de inhibición de la unión de anticuerpo monoclonal se calcula con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{100 - (TS - B) \times 100}{(CS - B)}$$

Dónde:

TS = media de densidad óptica de sueros problemas, CS = media de densidad óptica de suero control (de aves no infectadas), y B = densidad óptica del fondo.

El porcentaje de inhibición se determina cuando la media de densidad óptica en los pozos que contenían suero control es mayor de 0.3. Un valor de inhibición >30 % se considera indicador de la presencia de anticuerpos virales (Morales-Bertoulle, 2005; Fernández-Salas *et al.*, 2007).

### **5.2.1. Extendido Sanguíneo (frotis)**

Se llevaron a cabo en el laboratorio de Microbiología Veterinaria de la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de la Universidad Veracruzana en Tuxpan, Veracruz.

Se emplean portaobjetos sobre los cuales se colocan de 1 a 3 gotas pequeñas de sangre en uno de sus extremos mediante un tubo capilar, se dispone de otro portaobjeto en un ángulo de 45°, la sangre se distribuye por capilaridad en el

borde de la laminilla la cual se desliza de adelante hacia atrás hasta que se rebasa completamente la muestra.

Para la tinción de los extendidos sanguíneos se utiliza el kit comercial de Diff-Quik®, la cual es una tinción de tipo Romanowsky, muy rápida y simple, la cual consta de tres soluciones; la solución fijadora (fijador alcohólico) que actúa de mordiente en la cual se sumerge el portaobjetos durante 1 min., se retira y se escurre verticalmente sobre papel filtro, la solución I (colorante acidófilo) a base de eosina y en la cual se sumerge la laminilla durante 45 segundos se escurre nuevamente y se sumerge en la solución II (colorante basófilo) formada por el azul de metileno y el azul de toluidina, durante 5 a 60 segundos, posteriormente se enjuaga el portaobjetos con agua corriente durante 15 segundos y se coloca en posición vertical para permitir el secado del extendido. Posteriormente se examinan microscópicamente usando los objetivos de seco débil (10x), con el cual se verifica la calidad y uniformidad, el objetivo de seco fuerte (40x), con el cual se realiza reconocimiento panorámico, se observa distribución celular y se selecciona el campo de interés, se agrega aceite de inmersión y se observa bajo el objetivo de inmersión (100x). Se realizan recorridos del campo con una dirección de zigzag, identificando las células sanguíneas mediante morfología y coloración y se buscan los parásitos de la malaria aviar, en glóbulos rojos *Plasmodium* spp. y *Haemoproteus* spp. y en glóbulos blancos *Leucocytozoon* spp. Para la

identificación morfológica de los hemoparásitos se recurre a literatura especializada (Matta y Rodríguez, 2001; Valkiūnas, 2005; Quiroz, 2005).

### **5.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos se evaluaron mediante análisis estadísticos de Chi-Cuadrada, utilizando el Software R version 2.10.1.

Las variables estudiadas fueron expresadas en valores absolutos y porcentuales, se aplicó el tratamiento de edad y sexo (cuadro 1), considerando estadísticamente significativo todo valor de probabilidad menor de 0,05 ( $P < 0,05$ ).

**Cuadro 1.** Prevalencia de hemoparásitos de la malaria aviar (*Haemoproteus* spp., *Leucocytozoon* spp. y *Plasmodium* spp.).

VARIABLE DE RESPUESTA	TRATAMIENTO	NIVELES DE TRATAMIENTO	ESTADÍSTICO UTILIZADO
Prevalencia de la malaria aviar	Edad	Juveniles Adultos	Chi-Cuadrada mediante tablas de Contingencia
Prevalencia de la malaria aviar	Sexo	Machos Hembras	
Prevalencia de H, L y P.	Edad	Juveniles Adultos	
Prevalencia de H, L y P.	Sexo	Machos Hembras	

H: *Haemoproteus* spp.; L: *Leucocytozoon* spp.; P: *Plasmodium* spp.

## **VI. RESULTADOS**

### **6.2. INDIVIDUOS CAPTURADOS**

Se analizaron 57 muestras (N=57) de sangre de individuos de gaviota reidora americana (*L. atricilla*) capturados mediante trampas cebadas y capturas accidentales, de las cuales 21 fueron machos, 20 hembras y 16 individuos no se identificó el sexo, así mismo 41 individuos fueron adultos y 16 juveniles.

### **6.3. VIRUS DEL OESTE DEL NILO**

Se analizaron 57 muestras de sueros sanguíneos para identificar la presencia de anticuerpos contra el virus del Oeste del Nilo, en ninguna de las muestras se evidencio seropositividad en la gaviota reidora americana *L. atricilla*.

#### 6.4. PRESENCIA DE PARÁSITOS DE LA MALARIA AVIAR

Se obtuvo una presencia de 25 individuos positivos y 32 negativos a hemoparásitos de la malaria aviar, resaltando la presencia de coinfección en un individuo. De los 25 individuos positivos, 16 fueron adultos y 9 juveniles. El hemoparásito que mostró mayor presencia fue *Haemoproteus* spp., con 20 individuos, de los cuales 12 fueron adultos y 8 juveniles; *Leucocytozoon* spp., se presentó en 4 individuos (3 adultos y 1 juvenil) y *Plasmodium* spp., solo se encontró en un individuo adulto (cuadro 2).

**Cuadro 2.** Presencia de hemoparásitos de la malaria aviar por edad en *L. atricilla*.

<b>Parásitos de la Malaria aviar</b>	<b>Adultos</b>	<b>Juveniles</b>	<b>Totales por hemoparásito</b>
<i>Haemoproteus</i> spp.	12	8	20
<i>Leucocytozoon</i> spp.	3	1	4
<i>Plasmodium</i> spp.	1	0	1
<b>Totales por edad</b>	<b>16</b>	<b>9</b>	<b>25</b>

En cuanto a la presencia de los hemoparasitos por sexo 6 individuos machos, 6 hembras y 8 individuos en los que no se pudo identificar el sexo fueron positivas a *Haemoproteus* spp., en el caso de *Leucocytozoon* spp., 2 machos, una hembra y un individuo sin identificación de sexo fueron positivos y para *Plasmodium* spp., solo se presentó en una hembra (cuadro 3).

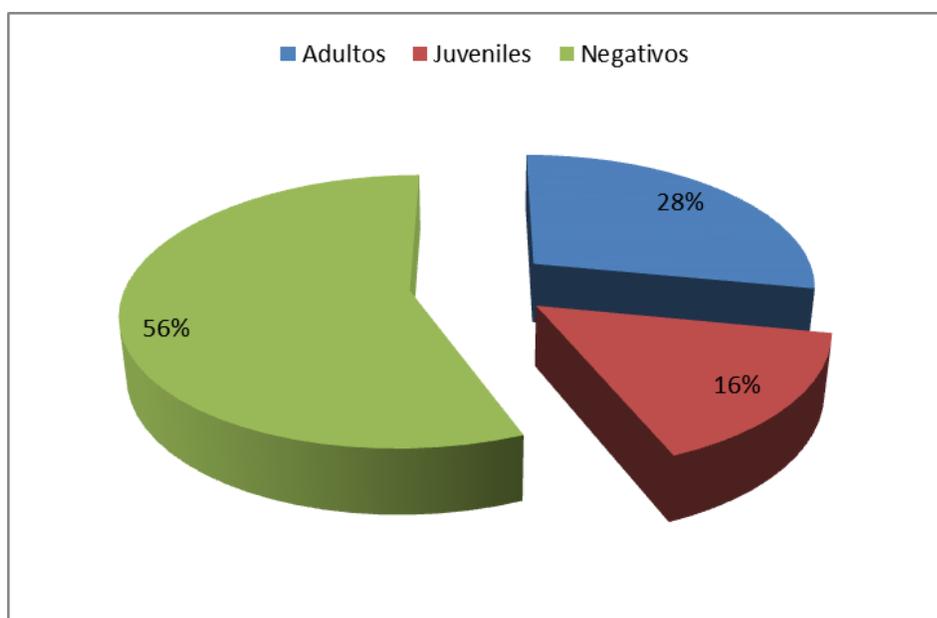
**Cuadro 3.** Presencia de hemoparásitos de la malaria aviar por sexo en *L. atricilla*.

<b>Parásitos de la Malaria aviar</b>	<b>Machos</b>	<b>Hembras</b>	<b>Sin identificación de sexo</b>	<b>Totales por hemoparásito</b>
<i>Haemoproteus</i> spp.	6	6	8	20
<i>Leucocytozoon</i> spp.	2	1	1	4
<i>Plasmodium</i> spp.	0	1	0	1
<b>Totales por sexo</b>	<b>8</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>25</b>

## 6.5. PREVALENCIA DE PARÁSITOS DE LA MALARIA AVIAR

La prevalencia de la malaria aviar fue de 43.86%, de los cuales los individuos adultos presentan un 28.07% y los juveniles un 15.79% de las infecciones (figura 9). Estas prevalencias relacionadas a la edad (adultos y juveniles) de *L. atricilla*

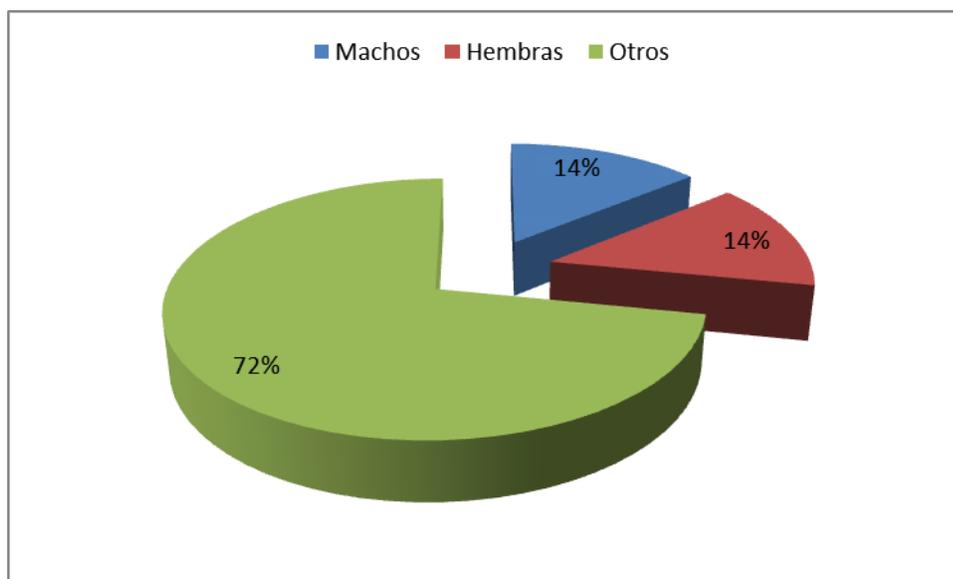
nos indican que los adultos se parasitan más que los juveniles (figura 9), sin embargo, estadísticamente no se encontraron diferencias significativas mediante una prueba de Chi-Cuadrada con tablas de Contingencia de 2x2 con la corrección de Yates ( $X^2= 3.745$ ,  $gl= 1$ ,  $p= 0.05297$ ), sin embargo las tendencias se dirigen a que si puede haber diferencias en las prevalencias entre edades.



**Figura 9.** Prevalencia de la malaria aviar por edad.

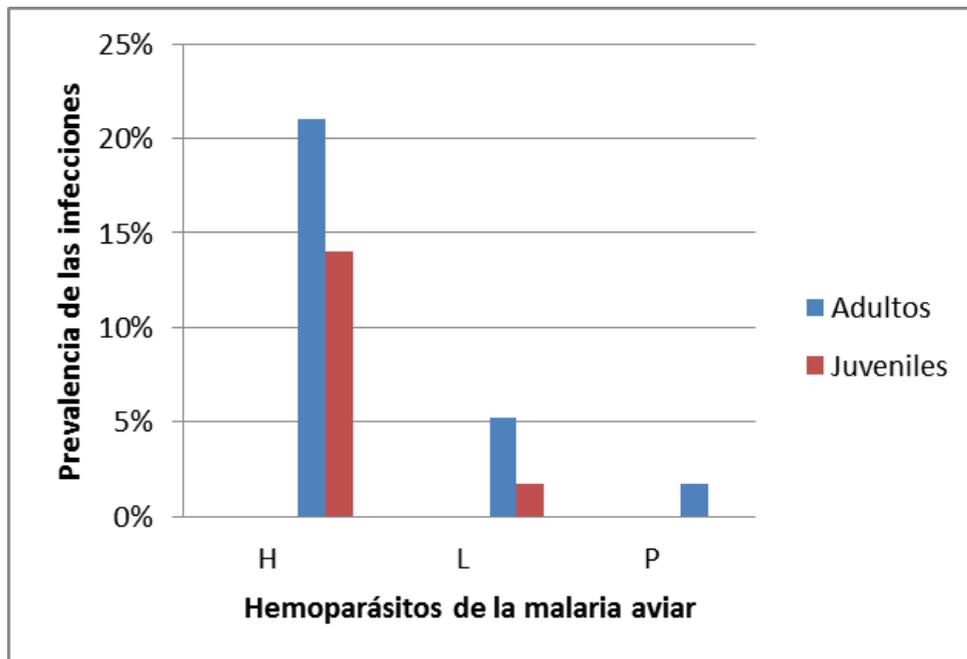
La prevalencia de la malaria aviar por sexo fue similar ya que tanto hembras como machos presentaron un 14.04% de prevalencia (figura 10), sin incluir un 15.79% de individuos positivos en los que no se pudo identificar el sexo. Así mismo, mediante una prueba de Chi-Cuadrada con tablas de Contingencia de 2x2 y la

corrección de Yates ( $X^2= 0.0414$ ,  $gl= 1$ ,  $p= 0.8387$ ), no se encontraron diferencias estadísticas significativas.



**Figura 10.** Prevalencia de la malaria aviar por sexo.

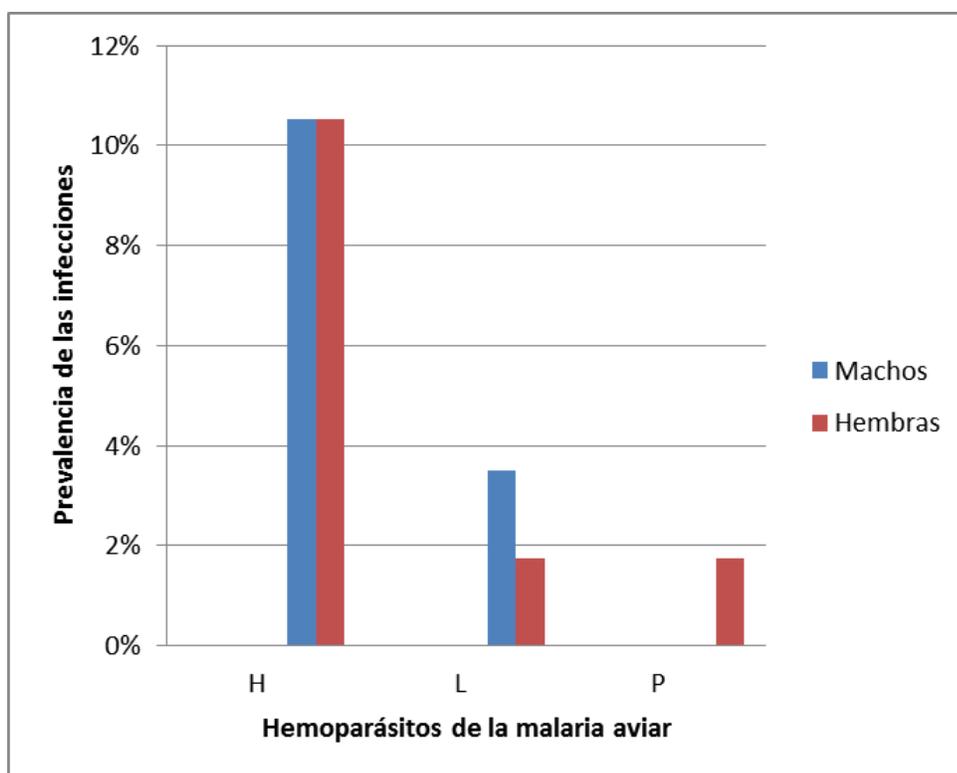
La prevalencia de las especies de hemoparásitos fue, en el caso de *Haemoproteus* spp. 35.09%, de los cuales los adultos con 21.05% y los juveniles 14.04%; *Leucocytozoon* spp. mostró un 7.02% de prevalencia (5.26% en adultos y 1.75% en juveniles); y en el caso de *Plasmodium* spp. solo presentó 1.75% de prevalencia en adultos (figura 11).



**Figura 11.** Prevalencia de los hemoparásitos de la malaria aviar por edad en *L. atricilla* (H: *Haemoproteus* spp.; L: *Leucocytozoon* spp.; P: *Plasmodium* spp.).

En la gráfica (figura 11) se observan diferencias visuales en cuanto a las prevalencias por especie, sin embargo no se encontraron diferencias estadísticas significativas en las prevalencias de hemoparásitos por edades mediante una prueba de Chi-cuadrada con tablas de Contingencia de 2x2 y la corrección de Yates ( $X^2 = 0.105$ ,  $gl = 1$ ,  $p = 0.746$ ), cabe mencionar que en este análisis no se consideró al hemoparásito *Plasmodium* spp. debido a que se trata de un número limitado de muestras positivas.

La prevalencia de los hemoparásitos de la malaria aviar por sexos fue, en el caso de *Haemoproteus* spp. 10.53% tanto para machos como hembras, *Leucocytozoon* spp. mostró una prevalencia de 3.51% para machos y 1.75% en las hembras, *Plasmodium* spp. presento 0% para machos y 1.75% en las hembras (figura 12). En este caso se utilizó una prueba estadística de Chi-Cuadrada con tablas de Contingencia de 2x2 para ver los niveles de significancia en las prevalencias de infección de hembras y machos con respecto a las especies de parásitos *Haemoproteus* spp. y *Leucocytozoon* spp., en los cuales no se observaron diferencias significativas ( $X^2=0.0398$ ,  $gl=1$ ,  $p=0.8419$ ).



**Figura 12.** Prevalencia de malaria aviar por sexo en *L. atricilla* (H: *Haemoproteus* spp.; L: *Leucocytozoon* spp.; P: *Plasmodium* spp.).

## VII. DISCUSIÓN

Las aves son organismos importantes en el estudio de enfermedades emergentes y reemergentes, debido a la posición que ocupan en la escala trófica, además de ser individuos que pueden ser portadores, replicadores y transmisores de una gran cantidad de enfermedades de importancia en salud pública y salud ecosistémica, tales como el virus del Oeste del Nilo y los parásitos de la malaria aviar, también pueden encontrarse la Influenza, la enfermedad de Lyme, *Campylobacter* spp., Salmonelosis, entre otras (Reed *et al.*, 2003). En ese estudio se evidenció la presencia de una enfermedad emergente (la malaria aviar), se identificaron tres especies de hemoparásitos causantes de esta enfermedad, siendo los primeros reportes de estos hemoparásitos en la región, en el caso de WNV no se encontraron aves seropositivas a esta enfermedad, aspectos que se discutirán de acuerdo a los resultados obtenidos para cada una de estas enfermedades infecciosas emergentes.

### 7.1. VIRUS DEL OESTE DEL NILO

Como ya se mencionó anteriormente las aves son organismos importantes para el estudio de enfermedades emergentes y reemergentes ya que son importantes en

la salud pública porque pueden estar infectadas por varios microorganismos zoonóticos (Reed *et al.*, 2003), se han relacionado con el transporte de estas enfermedades a través de sus rutas de migración (Dusek *et al.*, 2009; Reisen *et al.*, 2010), se cree que el agotamiento causa en estas un estrés que conlleva a inmunosupresión y favorece la replicación de WNV, sin que sea necesaria la presentación de un cuadro clínico ya que al igual que en humanos, el 80% de los casos en aves, son asintomáticos (Rappole *et al.*, 2000).

En este estudio se utilizó a la especie *L. atricilla*, debido a que WNV ha sido detectado en alrededor de 300 especies de aves, incluyendo silvestres y domésticas (Medica *et al.*, 2007; Goodman y Cuningham, 2007), y cualquier especie de ave puede ser reservorio de WNV (Ziegler *et al.*, 2010). Además que Van der Meulen *et al.*, (2005), menciona que las especies del orden *Charadriiforme*, como es el caso de la gaviota reidora (*L. atricilla*) son más susceptibles a la enfermedad, sin embargo no presentan las tasas de morbilidad y mortalidad como son los córvidos, a pesar de eso, en este estudio no se encontraron aves positivas al WNV, en otros estudios se han reportados como positivas a la gaviota de pico anillado (*Larus delawarensis*), pero no han presentado cuadros severos e incluso se muestran asintomáticos (Vázquez, 2009).

La prevalencia de WNV en este trabajo fue de cero, lo cual coincide con otros trabajos realizados en aves silvestres en Veracruz (Vázquez, 2009), es probable que esto se debe a que las gaviotas no estén participando en la propagación del WNV o que no hayan sido expuestas a esta enfermedad y por lo tanto no muestran seropositividad, sin embargo, esto no exenta a la región de la circulación de WNV, ya que Rodríguez, (2012), realizó un estudio en equinos y reporta 17.1% de prevalencia para WNV en Veracruz. Vázquez, (2009), reporta como positivas gaviotas de pico anillado (*Larus delawarensis*) en Tamaulipas, lo cual coincide con las rutas de migración del Golfo y del Atlántico, podría relacionarse estas aves con la especie en estudio por pertenecer al mismo orden, sin embargo en Tuxpan, Veracruz *L. atricilla* no mostró individuos positivos. Por otro lado, los casos de aves diagnosticadas en el sur de México (Tabasco y Yucatán), se relacionan a las rutas de migración del sur de Estados Unidos al Golfo de México y el Caribe, lo que indica que las regiones donde más se han reportados aves positivas a WNV son los que coinciden con las dos rutas de migración mencionadas anteriormente, por una parte en los estados del Norte de México y por otro los del Golfo de México y el Caribe (Deardorff *et al.*, 2006), lo cual se relaciona con lo reportado por Dusek *et al.*, (2009) que indica que la seropositividad de las aves silvestres a WNV se relaciona a los movimientos migratorios de las aves.

En México a pesar de que se ha reportado el WNV en varios estados de la república y en varias especies de animales, incluyendo a los humanos, las

prevalencias obtenidas han sido bajas y no han tenido los mismos impactos, tanto de morbilidad como de mortalidad, como ha sucedido en otros países como Estados Unidos, esto probablemente se deba a que en México se cuenta con otros flavivirus endémicos, tal es el caso del Dengue, lo que podría causar reacción cruzada de anticuerpos y protección temporal contra WNV o casos menos severos (Ramos y Falcón, 2004; Fernández-Salas *et al.*, 2007; Garza *et al.*, 2010), esto no solo sucede en México sino también en Latinoamérica y el Caribe, donde el WNV se comporta de manera similar, lo cual estaría relacionado a las mismas condiciones de presencia de arbovirosis en estas áreas como sucede en México (Berrocal *et al.*, 2006).

A pesar de los resultados obtenidos en este estudio, el riesgo potencial se encuentra latente para México, América central, el Caribe y Sur América, debido a la abundancia de mosquitos vectores durante todo el año, así como de aves silvestres migratorias y residentes y si bien, actualmente no se han presentado epidemias y/o epizootias, el WNV se encuentra circulando en México, Cuba, República Dominicana, Bahamas, Argentina, Islas Caimán, Martinica, Jamaica, Guadalupe, El Salvador, Colombia, lo cual habla de la rapidez con que se propagado el WNV (Berrocal *et al.*, 2006), atribuyéndose a las aves silvestres migratorias como los principales transportadores naturales de patógenos a través de sus rutas migratorias (Rappole *et al.*, 2000; Ruelas, 2006).

Los patógenos de las enfermedades infecciosas emergentes como el WNV y la malaria aviar, generan problemas, tanto para la protección de las especies en riesgo, como para el mantenimiento de la biodiversidad. De ahí que resulta importante el estudio de las enfermedades en los ecosistemas, que a la vez, ayuden al manejo de los recursos naturales bajo la premisa que “la salud de los ecosistemas se refleja en los organismos que lo habitan” (Godínez *et al.*, 2006).

De manera general, para llevar a cabo un mejor control en los planes de manejo de las enfermedades emergentes como el WNV, es indispensable un monitoreo constante de las aves silvestres migratorias y residentes, así como de otros hospederos y vectores, ya que sabemos que en la zona, por su ubicación geográfica, diversidad de reservorios y vectores y características con predominio tropical reúne todas las condiciones que favorecen la entrada y desarrollo de malaria aviar y WNV, así como de otras enfermedades emergentes y reemergentes.

## **7.2. PARÁSITOS DE LA MALARIA AVIAR**

Se ha demostrado que la modificación de hábitat de origen antropogénico (cambios en el uso del suelo, incluyendo la deforestación, la construcción de

carreteras y las invasiones agrícolas y ganaderas) se han relacionado con el aumento en la prevalencia de enfermedades infecciosas afectando a los sistemas hospedero-parásito y el resultado de prevalencias de parásitos hemosporidios en las aves silvestres (Chasar *et al.*, 2009).

El parasitismo representa una entramada red de relaciones complejas en las que se involucran una enorme diversidad de organismos, parásitos sanguíneos, vectores (dípteros) y hospedadores (aves) (Martínez, 2008).

Los parásitos sanguíneos son muy comunes en las muchas especies de aves en su hábitat natural, sin embargo, se ha observado que las aves acuáticas parecen ser menos susceptibles a estos incluso en presencia de vectores potenciales (Quillfeldt *et al.*, 2011).

Los resultados de este estudio demuestran, la presencia de los parásitos de la malaria aviar en *L. atricilla*, estos coinciden con Leal, (2010), quien reporta los hemoparásitos *Plasmodium* spp., *Haemoproteus* spp. y *Leucytozoon* spp. en la mascarita transvolcánica (*Geothlypis speciosa*), en los estados de Michoacán y el Estado de México, y esto se debe probablemente a que la zona presenta las condiciones adecuadas para su proliferación, tales como ubicación geográfica,

clima y amplia diversidad de vectores (Quiroz, 2005); en cuanto a las prevalencias de infección por parte de estos hemosporidios se encontró una prevalencia de 43.85% la cual es una prevalencia alta comparada con otros estudios en donde la familia Laridae ha mostrado 9,2% de prevalencia para distintos hemoparásitos, estas diferencias pueden deberse principalmente a que las gaviotas se adaptan fácilmente a ambientes urbanos altamente perturbados, donde puede haber una mayor cantidad de vectores que en los ambientes salinos (Figuerola, 1999). Esto indica que las gaviotas de la zona de estudio se desenvuelven en estos ambientes, además de las condiciones tropicales, ya que ha sido observado que en estas zonas hay mayor prevalencia de hemoparásitos, por las condiciones climatológicas y abundancia de vectores principalmente (Quillfeldt *et al.*, 2011). Sin embargo, las prevalencias obtenidas en *L. atricilla* son menores a las reportadas en otros estudios realizados en México, Álvarez, (2010), encontró prevalencias para *Leucocytozoon* spp. de 83% y *Plasmodium* spp. 86%, en el Verdugo Americano (*Lanius luduvicianus*).

Otra condición que se presentó en este estudio fue un individuo con coinfección, esto no es común en aves acuáticas, pero coincide con los resultados en otros estudios, en donde de 60 especies de aves acuáticas analizadas 25 presentaron algún tipo de hemoparásito y solo 5 presentaron infección múltiple y de estas la gaviota patiamarilla *Larus cachinnans* (Quillfeldt *et al.*, 2011), perteneciente a la familia Laridae a la cual también pertenece la gaviota reidora americana *L. atricilla*,

lo cual podría dar paso a realizar un estudio más extenso donde se evalúe esta condición y así poder sugerir que a pesar de que las coinfecciones no son muy comunes, la familia Laridae puede ser más susceptible a infecciones múltiples.

En este estudio el parásito que mostró mayor prevalencia fue *Haemoproteus* spp. (35.09%), seguido de *Leucocytozoon* spp. (7.02%) y *Plasmodium* spp. con (1.75%), no mostraron diferencias estadísticas significativas entre sexos y edades, sin embargo las tendencias se inclinaron con mayor prevalencia hacia los individuos adultos ( $X^2= 3.745$ ,  $gl= 1$ ,  $p= 0.05297$ ), estas tendencias se han observado en otros estudios, lo cual sugiere que la probabilidad de infección aumenta con la exposición acumulativa a través del tiempo (Mendes *et al.*, 2005), en el caso del sexo no se marcó ninguna tendencia.

En el caso de *Haemoproteus* spp. anteriormente había sido diagnosticado en aves acuáticas del Golfo de California (Godínez *et al.*, 2006), además este parásito es de los más comunes en las gaviotas y su distribución está asociado a zonas tropicales (Quillfeldt *et al.*, 2010).

En cuanto a las implicaciones que tienen los parásitos de la malaria aviar en la salud de los individuos, Bosh *et al.*, (1997), realizó un estudio en gaviota de patas

amarillas (*Larus cachinnans*) donde no se encontró diferencia en las prevalencias de *Haemoproteus lari* en cuanto a sexo, edad, sitios de anidación, año de muestreo. Sin embargo, se observó que las hembras infectadas solían tener nidadas más pequeñas y su condición corporal disminuye; en machos no se relacionan estos parámetros. Por otro lado, una de las cuestiones clave es esclarecer cómo estos son capaces de afectar la evolución y el tamaño poblacional de sus hospedadores, se ha comprobado que al reducir experimentalmente la intensidad de infecciones por parásitos sanguíneos, se incrementa el éxito reproductor en aves silvestres, ya que los individuos parasitados o enfermos tienen menor probabilidad de transmitir su descendencia (Merino *et al.*, 2000; Tabor *et al.*, 2001; Marzal *et al.*, 2005). También se ha demostrado que estos parásitos son capaces de afectar la supervivencia de las aves silvestres (Martínez, 2008), en otro estudio se demostró como aves de la especie *Corvus monedula* infectadas por parásitos de la malaria aviar presentaron efectos adversos sobre la supervivencia de las mismas, al presentar acortamiento de los telómeros (Figuerola *et al.*, 2013), además se ha observado que éstos hemoparásitos pueden permanecer de manera latente en los órganos y regresar a la circulación periférica durante la época reproductiva (Valkiūnas, 2005).

A pesar de que existen muchos estudios en parásitos de la malaria aviar para muchas especies de aves en distintas regiones continentales, para México los estudios son pobres por lo que es indispensable implementar el estudio de estos

parásitos combinando técnicas moleculares y técnicas clásicas de diagnóstico en diversas especies de aves y en diversas condiciones, así como las interacciones que estos guardan tanto con los hospederos como con los vectores y los patrones de coevolución de los parásitos, los hospederos y vectores (Pérez-Tris, *et al.*, 2005).

## 8. CONCLUSIONES

Se evidenció por primera vez la presencia de los hemoparásitos de la malaria aviar (*Plasmodium* spp., *Haemoproteus* spp. y *Leucytozoon* spp.) en aves de la región, lo cual sirve de evidencia para realizar futuras investigaciones en otras especies de aves y en los vectores que intervienen en su transmisión.

La prevalencia total de los parásitos de la malaria aviar fue de 43.85%, el que mostró mayor prevalencia fue *Haemoproteus* spp. con 35.09%, seguido de *Leucytozoon* spp. 7.05% y *Plasmodium* spp., que solo mostró 1.75% de prevalencia.

No se encontraron diferencias significativas en las prevalencias de parásitos de la malaria aviar entre sexos y edades.

No se encontraron individuos positivos con anticuerpos contra el WNV en *Leucophaeus atricilla*, es probable que esta especie no ha sido expuesta a esta enfermedad, sin embargo, esto no exenta del riesgo potencial de WNV en la región.

## 9. APLICACIONES PRÁCTICAS DEL TRABAJO

El diagnóstico de las enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes es de gran importancia tanto para la conservación de la biodiversidad como en el área de salud pública. Con la identificación de algunos patógenos que afectan a *L. atricilla*, se podrán realizar investigaciones futuras en otras especies de aves, en los vectores o en distintos hospederos, que a su vez servirán de apoyo local y que pueden ser de referencia para otros estudios en México, ya que existe poca información principalmente para hemoparásitos aviares y los roles que desempeñan en las especies y los ecosistemas.

Los resultados obtenidos en este estudio pueden ser la base de futuras investigaciones en el área de medicina de la conservación, sobre especies que tengan alguna importancia ecológica, especies endémicas, especies migratorias, resaltando sobre todo aquellas que presenten alguna categoría de protección especial en la NOM-059-SEMARNAT-2010; en las cuales se puedan monitorear a corto, mediano y largo plazo enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes de importancia en salud animal, salud pública y salud ecosistémica.

Es importante involucrar a diversas organizaciones tanto gubernamentales como no gubernamentales, públicas y privadas para el apoyo de proyectos de investigación, para la capacitación, el monitoreo y control de las diversas enfermedades emergentes y reemergentes que se presenten en la región, debido a que se necesita de una alerta temprana y una respuesta rápida frente a estos patógenos.

En general lo que se busca es desarrollar planes de manejo y de contingencia contra las enfermedades emergentes y reemergentes de importancia en la salud pública, animal y ecosistémica. Por mencionar algunas enfermedades de interés tenemos además de WNV y la malaria, el dengue, la tuberculosis, la rabia, la influenza, la leptospirosis, la brucelosis, la enfermedad de Lyme, la enfermedad de Chagas, leishmaniasis, entre otras.

## 10. RECOMENDACIONES

Se recomienda continuar el monitoreo epidemiológico tanto en esta área como en otras, en donde estas enfermedades representen un riesgo, se sugiere realizar estudios más extensos en cuanto a especies de aves, número de individuos y tiempo de muestreo en distintas épocas del año.

Una de las propuestas concretas que se recomiendan en el manejo de las enfermedades emergentes y reemergentes para la conservación de la vida silvestre y los sistemas ecológicos es la integración multidisciplinaria de profesionales bajo los conceptos de la medicina de la conservación, implementando mayor vigilancia, más investigación, capacitación de personal, laboratorios y sobre todo dedicar más recursos para los sistemas de salud humana, animal y ecosistémica.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

Álvarez, M.I. 2010. Perfil hematológico y hemoparásitos de una población residente del verdugo americano (*Lanius ludovivianus*, Laniidae: Aves) en Michoacán, México. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás Hidalgo. Morelia, Mich., México.

Arrivillaga, J. y Caraballo, V. 2009. Medicina de la Conservación. Revista Biomédica. **20(1)**: 55-67.

Atkinson, C.T., Dusek, R.J. y Lease, J.K. 2001. Serological responses and immunity to superinfection with avian malaria in experimentally-infected Hawaii Amakihi. Journal of Wildlife Diseases. **37(1)**: 20-7.

Bensch, S, Hellgren, O. y Pérez-Tris, J. 2009. MalAvi: a public database of malaria parasites and related haemosporidians in avian hosts based on mitochondrial cytochrome b lineages. Molecular Ecology Resources. **9(5)**: 1353-1358.

Berguer, D.D. y Mueller, H.C. 1959. The Bal-chatri: a trap for the birds of prey. *Bird Banding*. **30(1)**: 18-26.

Berrocal, L., Peña, J., González, M. y Mattar, S. 2006. Virus del Oeste del Nilo: ecología y epidemiología de un patógeno emergente en Colombia. *Revista Salud Pública*. **8(2)**: 218-228.

Bosh, M., Figuerola, J., Cantos, F.J. y Velarde, R. 1997. Intracolony differences in the infestation by *Haemoproteus lari* on Yellow-legged Gulls *Larus cachinnans*. *Ornis Fennica*. **74(2)**: 105-112.

Burger, J. y Gochfeld, M. 2002. Effects of Chemicals and Pollution on Seabirds. pp. 485-526. En: *Biology of Marine Birds*. Scheiber, E. A. y Burger, J. (eds.). Ed. CRC Press, USA. 722 pp.

Cantos, M.F.J. 2009. Gaviota reidora (*Larus ridibundus*). 17-32 pp. En: *Gaviota reidora, sombría y patiamarilla en España. Población en 2007-2009 y método de censo*. Molina, B. (ed.). Ed. SEO/BirdLife. Madrid, España. 166 pp.

Ceballos-Lascuráin, H., Howell, N.G.S., Ramos, M.A. y Swift, B. 2000. Aves comunes de México. Ed. Diana, México, D.F. 102 pp.

CENAVECE (Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades). 2012. Guía para la vigilancia, prevención y control del virus del Oeste del Nilo. Secretaría de Salud, SEMARNAT, SAGARPA. México, DF. 42 pp.

Chasar, A., Loiseau, C., Valkiūnas, G., Iezhova, T., Smith, T.B. y Sehgal, R.N.M. 2009. Prevalence and diversity patterns of avian blood parasites in degraded African rainforest habitats. *Molecular Ecology*. **18(19)**: 4121-4133.

Ciudoderis-Aponte, K. 2009. Virus del oeste del nilo (von): Enfermedad zoonótica emergente de posible importancia en Colombia. *Orinoquia*. **13(1)**: 46-58.

CONABIO. 2008. Manglares de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México. 38 pp.

Contreras, B.A., Tejeda, T.A.G., y García, S.J.A. 2003. Las aves como plaga, controles y manejo. *Ciencia UANL*. **6(1)**: 93-98.

Cortés, M. y Luna-Jorquera, G. 2011. Efecto de la edad y la localidad en la concentración de cadmio y cobre en el hígado de la gaviota dominicana *Larus dominicanus*. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. **46(2)**: 287-292.

Daszak, P. y Cunninham, A.A. 2002. Emerging Infectious Diseases. A Key role for Conservation Medicine. pp. 40-61. En: Conservation Medicine: ecological health in practice. Aguirre, A.A., Ostfield, R.S., Tabor, G.M., House, C. y Pearl, M.C. (eds.). Ed. Oxford University Press. New York, USA. 407 pp.

De la Cruz, G. C. M. 2004. Enfermedades emergentes y reemergentes. *Salud en Tabasco*. **10(3)**: 267-268.

Deardorff, E., Estrada-Franco, J.G., Brault, A.C., Navarro-López, R., Campomanes-Cortés, A., Paz-Ramírez, P., Solís-Hernández, M., Ramey, W.N., Davis, C.T., Beasley, D.W.C., Tesh, R.B., Barret, A.D.T. y Weaver, S.C. 2006. Introductions of West Nile Virus Strains to Mexico. *Emerging Infectious Diseases*. **12(2)**: 314-318.

Díaz-Badillo, A., Bolling, B. G., Pérez-Ramírez, G., Moore C.G., Martínez-Muñoz, J. P., Padilla-Viveros, A. A., Camacho-Nuez, M., Díaz-Pérez, A., Beaty, B.J. y

Muñoz, M. D. 2011. The distribution of potential West Nile virus vectors, *Culex pipiens pipiens* and *Culex pipiens quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae), in Mexico City. *Parasites and Vectors*. **4(70)**: 1-33.

Dusek, R.J., McLean, R.G., Kramer, L.D., Ubico, S.R., Dupuis II, A.P., Ebel, G. D., y Guptill, S.C. 2009. Prevalence of West Nile Virus in Migratory Birds during Spring and Fall Migration. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **81(6)**: 1151-1158.

Dupuis II, A. P., Marra, P. P. y Kramer, L. D. 2003. Serologic Evidence of West Nile Virus Transmission, Jamaica, West Indies. *Emerging Infectious Disease*. **9(7)**: 860-863.

Epstein, P.R. 2002. Biodiversity, Climate Change, and Emerging Infectious Diseases. En: *Conservation Medicine: ecological health in practice*. Aguirre, A.A., Ostfield, R.S., Tabor, G.M., House, C. y Pearl, M.C. (eds.). Ed. Oxford University Press. New York, USA. 407 pp.

Fair, J., Paul, E. y Jones, J. 2010. *Guidelines to the Use of Wild Birds in Research*. Ed. Ornithological Council: Washington, D.C., USA. 62 pp.

Farfán-Ale, J.A., Blitvich, B.J., Marlenee, N.L., Loroño-Pino, M.A., Puerto-Manzano, F., García-Rejón, J.E., Rosado-Paredes, E.P., Flores-Flores, L.F., Ortega-Salazar, A., Chávez-Medina, J., Cremieux-Grimaldi, J.C., Correa-Morales, F., Hernández-Gaona, G., Méndez-Galván, J.F. y Beaty, B.J. 2006. Antibodies to West Nile virus in asymptomatic mammals, birds, and reptiles in the Yucatan Peninsula of Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **74(5)**: 908-14.

Fernández-Salas, I., Garza-Rodríguez, M.L., Beaty, B.J., Ramos-Jiménez, J. y Rivas-Estilla, A.M. 2007. Presencia del Virus del Oeste del Nilo en el Noreste de México. *Salud Pública de México*. **49(1)**: 210-217.

Figuerola, J. 1999. Effects of salinity on rates of infestation of waterbirds by haematozoa. *Ecography*. **22(6)**: 681-685.

Figuerola, J., Marfil, C., Muñoz, J., Martínez-de la Puente, J., Cuevas, E. y Soriguer, R. 2013. Telomere shortening and survival probability in relation to avian malaria infection status: a long term study on Western Jackdaws (*Corvus monedula*). *International Conference on Malaria and Related Haemosporidian Parasites of Wildlife*. Lithuanian Academy of Sciences, Vilnius, Lithuania. 160 pp.

Gallardo, A.J.C., Velarde, G.E. y Arreola, A.R. 2004. Aves del Golfo de México y las áreas prioritarias para su conservación. En: Diagnóstico ambiental del Golfo de México. Caso, M., Pisanty, I. y Ezcurra, E. (eds.). Ed. Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT). México, D.F. 301-322 pp.

Garza, R.M.L., Rodríguez, R.D.R., Blitvich, B.J., Reyes, L.M.A., Fernández-Salas, I. Ramos, J.J., Farfán-Ale, J.A., Cazares, T.R., Martínez. L.C. Tavitás, A.M.I. y Rivas-Estilla, A.M. 2010. Serologic Surveillance for West Nile Virus and other Flavivirus in Febrile Patients, Encephalitic Patients and Asymptomatic Blood Donors in Northern Mexico. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. **10(2)**: 151-157.

Godínez, R.C., Santos del Prado, G.K., Zepeda, L.H., Aguirre, A., Anderson, D.W., Parás, G.A., Velarde, E. y Zavala, G.A. 2006. Monitoreo de poblaciones y condición de salud de aves marinas y lobos marinos en islas del norte del golfo de California, México. *Gaceta Ecológica*. **81(1)**: 31-45.

Goodman, S. y Cunningham, A. 2007. Plan de contingencia para la aparición del virus del oeste del Nilo en Galápagos. Laboratorio de Epidemiología, Patología y Genética de Galápagos (LEPG-G) “Fabricio Valverde, Fundación Charles Darwin y

Servicio Ecuatoriano de Sanidad Agropecuaria-Galápagos. Islas Galápagos, Ecuador. 29 pp.

González-Acuña, D., Barrientos, C., Corvalán, F., Lara, J., Ardiles, K., Doussang, D., Mathieu, C., López, J., Ortega, R., Torres, J., Cerda, F. y Figueroa, R. 2010. Comparación de cuatro métodos de captura de gaviotas dominicanas (*Larus dominicanus*). Boletín Chileno de Ornitología. **16(1)**: 21-31.

González, O.M.A.A., Guzmán, H.J., Martín, G.M.F. y Domínguez, V.L.E. 2003. Un método para la selección de aves bioindicadoras con base en sus posibilidades de monitoreo. Huitzil, Revista de Ornitología Mexicana. **4(2)**: 10-16.

Green, A.J. y Figuerola, J. 2003. Aves Acuáticas como bioindicadoras en los humedales. 47-60 pp. En: Ecología, Manejo y Conservación de humedales los Andes. Parcuillos, M. (ed.). Ed. Instituto de Estudios Almerienses. Almería, España. 257 pp.

Guzmán, M.G., Kourí, G. y Pelegrino, J.L. 2001. Enfermedades virales emergentes. Revista Cubana de Medicina Tropical. **3(1)**: 5-15.

Hall, R.A., Broom, A.K., Hartnett, A.C., Howard, M.J. y Mackenzie, J.S. 1995. Immunodominant epitopes on the NS1 protein of MVE and KUN viruses serve as targets for a blocking ELISA to detect virus-specific antibodies in sentinel animal serum. *Journal of Virology Methods*. **51(2-3)**: 201-210.

Hasselquist, D., Östman, Ö, Waldenström, J. y Bensch, S. 2007. Temporal patterns of occurrence and transmission of the blood parasite *Haemoproteus payevskyi* in the great reed warbler *Acrocephalus arundinaceus*. *Journal of Ornithology*. **148(4)**: 401-409.

Hellgren, O., Waldenström, J. y Bensch, S. 2004. A new pcr assay for simultaneous studies of *Leucocytozoon*, *Plasmodium*, and *Haemoproteus* from avian blood. *Journal of Parasitology*. **90(4)**: 797-802.

Hernández, S.M. 2010. Avifauna del sitio Ramsar No. 1602 "Manglares y Humedales de Tuxpan" y ambientes adyacentes. Tesis de Licenciatura. Universidad Veracruzana. Tuxpan, Ver., México.

Howell, S.N.G. y Webb, S. 1995. A guide to the birds of México and northern Central America. Ed. Oxford University Press. New York, USA. 851 pp.

INEGI. 2001. Tuxpan, Estado de Veracruz. Cuaderno Estadístico Municipal. Gobierno del Estado de Veracruz e Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. México. 180 pp.

Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L. y Daszak, P. 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* **451(7181)**: 990-993.

Knowles, S.C.L., Wood, M.J., Alves, R., Wilkin, T.A., Bensch, S. y Sheldon, B.C. 2011. Molecular epidemiology of malaria prevalence and parasitaemia in a wild bird population. *Molecular Ecology*. **20(5)**: 1062-1076.

Koch, M. 1996. Wildlife, people, and development: veterinary contributions to wildlife health and resource management in Africa. *Tropical Animal Health and Production*. **28(1)**: 68-80.

Krone, O., Waldenström, J., Valkiūnas, G., Lessow, O., Müller, K., Lezhova, T. A., Fickel, J. y Bensch, S. 2008. Haemosporidian Blood Parasites in European Birds of Prey and Owls. *Journal of Parasitology*. **94(3)**: 709-715.

Leal, A.A. 2010. Hemoparásitos, perfiles leucocitarios y presencia de metales pesados en la mascarita transvolcánica *Geothlypis speciosa* (Aves:Parulidae) en los lagos de Cuitzeo y Pátzcuaro (Michoacán) y Ciénegas del Lerma (Estado de México). Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich., México.

Lotta, A.I.A. 2010. Presencia de Simúlidos Ornitófilicos en el Parque Nacional Natural (PNN) Chingaza: Implicaciones en la transmisión del hemoparásito *Leucocytozoon sp.* Tesis de Maestría. Universidad de Colombia, Bogotá, Colombia.

Martínez, de la P.J. 2008. Interrelaciones entre hospedadores, vectores y parásitos sanguíneos en poblaciones de aves silvestres. Tesis Doctoral. Museo Nacional de Ciencias Naturales-CSIC. Madrid, España.

Marzal, A., de Lope, F., Navarro, C. y Møller, A.P. 2005. Malarial parasites decrease reproductive success: an experimental study in a passerine bird. *Oecologia* **142(1)**: 541-545.

Matta, N.E. y Rodríguez, O.A. 2001. Hemoparásitos aviares. Acta Biológica Colombiana. **6(1)**: 27-33.

Medica, D.L., Clauser, R. y Bildstein. 2007. Prevalence of West Nile Virus Antibodies in a Breeding Population of American Kestrel (*Falco sparverius*) in Pennsylvania. Journal of Wildlife Diseases. **43(3)**: 538-541.

Medina-Vogel, G. 2010. Ecología de enfermedades infecciosas emergentes y conservación de especies silvestres. Archivos de Medicina Veterinaria. **42(1)**: 11-24.

Mendes, L., Piersma, T., Lecoq, M, Spaans, B. y Ricklefs, R.E. 2005. Disease-limited distributions? Contrasts in the prevalence of avian malaria in shorebird species using marine and freshwater habitats. Oikos. **109(2)**: 396-404.

Merino, S., Moreno, J., Sanz, J.J. y Arriero, E. 2000. Are avian blood parasites pathogenic in the wild? A medication experiment in blue tits (*Parus caeruleus*). Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. **267(1461)**: 2507-2510.

Monsalve, B.S., Mattar, V.S. y González, T.M. 2009. Zoonosis transmitidas por animales silvestres y su impacto en las enfermedades emergentes y reemergentes. Revista MVZ Córdoba. **14(2)**: 1762-1773.

Morales-Betoulle, M.A. 2005. "Monitoreo preliminar del virus del oeste del Nilo (VON) en aves de Guatemala". Proyecto FODECYT No. 19-03. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYT), Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología (SENACYT), Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología (FONACYT), Centro de Estudios en Salud (CDC-CAP), Instituto de Investigaciones Universidad del Valle de Guatemala. Guatemala. 28 pp.

Muñoz, J., Becker, P.H., Sommer, U., Pacheco, P. y Schlatter, R.P. 2003. Seabird eggs as bioindicators of chemical contamination in Chile. Environmental Pollution. **126(1)**: 123-137.

Murray, K. O., Mertens, E. y Despres, P. 2010. West Nile virus and its emergence in the United States of America. Veterinary Research. **41(6)**: 67.

Pérez, P.C. 2009. Señales sexuales y contaminación por petróleo en una ave marina. Memoria de Doctorado. Universidad de Vigo. Vigo, España.

Pérez-Tris, J., Hasselquist, D., Hellgren, O., Krizanauskiene, A., Waldenström, J. y Bensch, S. 2005. What are malaria parasites? Trends in Parasitology. **21(5)**: 209-211.

Quillfeldt, P., Arriero, E., Martínez, J., Masello, J.F. y Merino, S. 2011. Prevalence of blood parasites in seabirds-a review. Frontiers in Zoology. **8(1)**: 26.

Quillfeldt, P., Martínez, J., Hennicke, J., Ludynia, K., Gladbach, A., Masello, J.F., Riou, S. y Merino, S. 2010. Hemosporidian blood parasites in seabirds-a comparative genetic study of species from Antarctic to tropical habitats. Naturwissenschaften. **97(9)**: 809-817.

Quiroz, H.R. 2005. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. Ed. Limusa. Mexico, D.F. 870 pp.

Ramos, C. y Falcón, L.J.A. 2004. La fiebre del Nilo occidental: una enfermedad emergente en México. *Salud pública de México*. **46(5)**: 488-490.

Rappole, J.H., Derrickson, S.R. y Hubálek, Z. 2000. Migratory birds and spread of West Nile virus in the Western Hemisphere. *Emerging Infectious Disease*. **6(4)**: 19-28.

Rapport, D.J. 1995. Ecosystem health: exploring the territory. *Ecosystem Health*. **1(1)**: 5-13.

Reed, K.D., Mecce, J.K., Henkel, J.S. y Shukla, S.K. 2003. Birds, Migration and Emerging zoonoses: West Nile Virus, Lyme Disease, Influenza A and Enteropathogens. *Clinical Medicine and research* **1(1)**: 5-12.

Reisen, W.K., Wheeler, S.S., García, S. y Fang, Y. 2010. Migratory Birds and the Dispersal of Arboviruses in California. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **83(4)**: 808-815.

Reyes-Villanueva, F., Barrientos-Lozano, L. y Rodríguez-Pérez, M. A. 2006. Patrón de alimentación de mosquitos (Diptera: Culicidae) transmisores del virus del Oeste del Nilo, recolectados sobre caballos y humanos en el norte de México. *Veterinaria México*. **37(4)**: 407-415.

Rodríguez, I.T. 2012. Seroprevalencia para el virus de la Encefalitis Equina Venezolana y virus del Oeste del Nilo en los municipios de Tuxpan, Tihuatlán y Espinal, Ver. Tesis de Licenciatura. Universidad Veracruzana. Tuxpan, Ver., México.

Rosiles, M.R., Cerecero, J. y Cervantes J. 2000. Brote de Aspergilosis en gaviotas. *Veterinaria México*. **31(3)**: 259-260.

Rossi, S.L., Ross, T.M. y Evans, J.D. 2010. West Nile Virus. *Clinics in Laboratory Medicine*. **30(1)**: 47-65.

Ruelas, I.E. 2006. La migración de las aves. 449-460 pp. En: Entornos veracruzanos: la costa de La Mancha. Moreno-Casasola, P. (ed.). Ed. Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, Ver. México. 576 pp.

Schreiber, E.A. 2002. Climate and Weather Effects on Seabirds. 179-215 pp. En: Biology of Marine Birds. Scheiber, E. A. y Burger, J. (eds.). Ed. CRC Press, USA. 722 pp.

Silva, M.P., Bastida, R. y Darrieu, C. 2000. Dieta de la gaviota cocinera (*Larus dominicanus*) en zonas costeras de la provincia de Buenos Aires Argentina. Ornitología Neotropical. **11(1)**: 331-339.

Stele, K.E., Linn, M.J., Schoepp, R.J., Omar, N.K., Geisbert, T.W., Manduca, R.M., Calle, P.P., Raphael, B.L., Clippinger, T.L., Larsen, T., Smith, J., Lanciotti, R.S., Panella, N.A. y Mac Namara, T.S. 2000. Pathology of Fatal West Nile Virus Infections in Native and Exotic Birds during the 1999 Outbreak in New York City, New York. Veterinary Pathology. **37(3)**: 208-224.

Suzán, A.G., Galindo, M.F. y Ceballos, G.G. 2000. La importancia del estudio de enfermedades en la conservación de fauna silvestre. Veterinaria México. **31(3)**: 223-230.

Tabor, G.M. 2002. Defining Conservation Medicine. 8-16 pp. En: Conservation Medicine: ecological health in practice. Aguirre, A.A., Ostfield, R.S., Tabor, G.M.,

House, C. y Pearl, M.C. (eds.). Ed. Oxford University Press. New York, USA. 407 pp.

Tabor, G.M., Ostfeld, R.S., Poss, M., Dobson, A.P., y Aguirre, A.A. 2001. Conservation biology and the health sciences: defining the research priorities of conservation medicine. 165-173 pp. En: Conservation Biology: Research Priorities for the Next Decade. Soulé, M.E. y Orians, G.H. (eds.). Ed. Island Press, Washington, D.C., USA. 307 pp.

Valkiūnas, G. 2005. Avian malaria parasites and other haemosporidia. Ed. Florida: CRC Press. Florida, USA. 521 pp.

Van der Meulen, K.M., Pensart, M.B. y Nauwynck, H.J. 2005. West Nile Virus in the Vertebrate World. Archives of Virology. **150(4)**: 637-657.

Van Riper III, C. 1991. Pathogenicity and epizootiology of avian haematozoa: Plasmodium, Leucocytozoon, and Haemoproteus. 19-48 pp. En: Bird-parasite interaction: Ecology, Evolution, and Behaviour. Loye, J.E. y Zuk, M. (eds.). Ed. Oxford University Press, Oxford, U.K. 406 pp.

Vázquez, A.A.A. 2009. Detección del virus del Oeste del Nilo en aves migratorias y residentes en México. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. México, D.F.

Ziegler, U., Seidowski, D., Globig, A., Fereidouni, S.R., Ulrich, R.G. y Groschup, M.H. 2010. Sentinel birds in wild-bird resting sites as potential indicators for West Nile virus infections in Germany. *Archives of Virology*. **155(6)**: 965-969.