



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE
LA SALUD ANIMAL

DETECCIÓN MOLECULAR Y SEROLÓGICA DE VIRUS DE INFLUENZA EN CERDOS
DE TRASPATIO DE UNA INTERFAZ CON PATOS SILVESTRES EN LERMA, ESTADO
DE MÉXICO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCION Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA
JESSICA PAOLA MATEUS ANZOLA

TUTOR PRINCIPAL
RAFAEL OJEDA FLORES
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

COMITÉ TUTOR
JOSÉ IVAN SÁNCHEZ BETANCOURT
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

HELIOT ZARZA VILLANUEVA
Universidad Autónoma Metropolitana – Lerma

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

DICIEMBRE 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mis padres *Nancy Janeth Anzola Pachón* y *Orlando Mateus Mejía* por su apoyo incondicional en la realización de mis sueños. Por creer en mí y mostrarme que lo imposible puede llegar a ser posible, por enseñarme a ser perseverante y paciente. Mis logros son sus logros.

A mi querido hermano *Andrés Orlando Mateus Anzola*, por ponerle música a la vida, porque a pesar de la distancia siempre me demostró lo que es la hermandad, por su cariño, sus palabras y sus sabios consejos. Este logro también es suyo.

A mi novio, mis amigos mexicanos y colombianos por su gran cariño, ayuda y compañía.

AGRADECIMIENTOS

A la *Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)*, mi alma mater, a la *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ)* y al programa de *Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal* por mi formación académica y desarrollo profesional.

A mi tutor *Dr. Rafael Ojeda Flores* por permitirme participar en este proyecto, por haber sido mi guía en este proceso de desarrollo académico, por su constante orientación, por compartirme de su conocimiento y brindarme siempre su apoyo.

A mis asesores *Dr. José Ivan Sánchez Betancourt* y *Dr. Heliot Zarza Villanueva* por su colaboración, apoyo y acompañamiento en este proyecto.

Al *Laboratorio de Ecología de Enfermedades y Una Salud*, especialmente a mis compañeros *Liliana Gaytán, Cecilia Montoya* y *Manuel Moguel*, por su colaboración en el trabajo de campo y de laboratorio. Asimismo, al *Dr. Oscar Rico Chávez* por su apoyo y asesoría en el diseño de las gráficas.

Al personal del *Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos (DMZC)* y de la *Unidad de Investigación de la FMVZ-UNAM*, especialmente al *Dr. René Segura* y la *Dra. Rebeca Martínez*, así como a *Brenda Maya* y *Carmen Gaytán* por la asesoría, capacitación y colaboración en el procesamiento de las muestras.

Al *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)* por el apoyo económico recibido durante la maestría. Al proyecto *PAPIIT IA-205916*, por el financiamiento otorgado para llevar a cabo la investigación.

Al *Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI)* y al *Laboratorio de Microdatos* por la información brindada sobre el “Censo Agrícola, Ganadero y Forestal 2007”, así como las facilidades prestadas para su análisis.

A los productores porque sin su cooperación hubiera sido imposible realizar el muestreo.

RESUMEN

Los sistemas productivos de traspatio contribuyen de manera significativa en la producción animal global y son una fuente importante de proteína en áreas rurales de México. Sin embargo, estas producciones familiares representan una interfaz que propicia interacciones entre animales domésticos, silvestres y humanos, favoreciendo la emergencia y propagación de agentes virales como el virus de influenza A (VIA). A pesar del papel de aves acuáticas como reservorios naturales de la mayoría de los subtipos de VIA y la participación de los cerdos en la ecología viral, se conoce poco acerca de la circulación viral en la interfaz cerdo doméstico - fauna silvestre en México. Por lo cual, el objetivo del presente estudio fue realizar diagnóstico serológico y molecular de VIA en cerdos de traspatio en una interfaz con patos silvestres en el Municipio de Lerma, Estado de México. Durante la temporada invernal 2016 - 2017, se colectaron 175 muestras nasales con hisopo y 115 muestras sanguíneas de porcinos de granjas de traspatio cercanas a la Ciénega de Atarasquillo (Chiconahuapan), considerada un área natural protegida y zona de conservación de aves. Se efectuó diagnóstico molecular por qRT-PCR y diagnóstico serológico mediante la técnica de IH contra los subtipos H1N1, H3N2 y H5N2 detectados en patos silvestres de la Ciénega en la misma temporada. Todas las muestras con hisopo resultaron molecularmente negativas a VIA. Sin embargo, se obtuvo una seropositividad de 56.52%, 26.95% y 0% para los subtipos H1N1, H3N2 y H5N2, respectivamente. Las granjas presentaron bajo nivel de bioseguridad, cría simultánea de diversas especies animales, falta de vacunación contra influenza porcina y una distancia de 0.8 a 2.7 km lineales respecto a otra granja, los cuales son factores de riesgo para la emergencia de VIA. Este estudio evidenció la presencia de anticuerpos en cerdos contra los virus aislados en patos silvestres de la ciénega de Atarasquillo y destaca la importancia de entender la dinámica de transmisión de VIA entre patos silvestres, aves de corral y cerdos mediante una aproximación integral con la combinación de datos serológicos y moleculares junto con información medioambiental y socioeconómica.

Palabras clave: RT-PCR, inhibición de la hemaglutinación, transmisión interespecie, co-seropositividad.

ABSTRACT

Backyard farms make a significant contribution to animal production globally and represent an increasingly important source of protein in the rural Mexican household. However, these productive systems represent an interface where interactions between domestic animals, wildlife and humans occurs. Those interactions enhance the emergence and spread of viral pathogens like Influenza A virus (IAV). Although waterfowl are the main natural reservoir for almost all the subtypes of IAV and pigs have an important role in the viral ecology, some gaps remain in our knowledge of IAV transmission in the pig - wildlife interface in Mexico. Hence, the aim of this study is to perform molecular and serological detection of IAV in backyard pigs at an interface with wild ducks in Lerma, Estado de México. During the 2016 - 2017 winter season, 175 nasal samples and 115 blood sample were collected from pigs of backyard farms close to Atarasquillo (Chiconahuapan) Marsh, a natural protected area and bird conservation zone with migratory and resident waterfowl. The molecular and serological diagnosis was performed by qRT-PCR and HI against the IAV subtypes H1N1, H3N2 and H5N2 detected in the marsh's waterfowl at the same sampling period. Negative molecular results were obtained in all the nasal samples. However, a seropositivity of 56.52%, 26.95% and 0% against H1N1, H3N2, and H5N2 was detected, respectively. These backyard farms were characterized by low schemes of biosecurity, breeding of multiple animal species, no vaccination against swine influenza and a linear distance of 0.8 and 2.7 km to another farm which are considered risk factors in the emergence of IAV. This study indicates that antibodies against influenza virus isolated of wild ducks circulate in backyard pig farms close to the Atarasquillo's marsh and highlight the importance of understanding the dynamics of influenza viruses among wild birds, poultry, and pigs by an integral approximation based on the combination of serological and molecular data along with environmental and socioeconomic information.

Keywords: RT PCR, hemagglutination inhibition test, interspecies transmission, co-seropositivity.

CONTENIDO

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE CUADROS	viii
LISTA DE FIGURAS	viii
INTRODUCCIÓN	9
ANTECEDENTES	9
AGENTE ETIOLÓGICO	11
DINÁMICA DE TRANSMISIÓN DE VIRUS DE INFLUENZA	13
DIAGNÓSTICO DE VIRUS DE INFLUENZA	15
ECOLOGÍA DEL VIRUS DE INFLUENZA EN CERDOS DOMÉSTICOS	17
INFLUENZA EN LA INTERFAZ FAUNA SILVESTRE – ANIMAL DOMÉSTICO	21
JUSTIFICACIÓN	22
HIPÓTESIS	23
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
MATERIAL Y MÉTODOS	25
ÁREA DE ESTUDIO	25
CARACTERIZACIÓN REGIONAL DE LA INTERFAZ	26
COLECTA DE MUESTRAS	26
EXTRACCIÓN DE ARN	27
RT- PCR EN TIEMPO REAL	27
REPLICACIÓN DE ANTÍGENOS VIRALES	29
TITULACIÓN VIRAL	29
INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN	30
RESULTADOS	31
CARACTERIZACIÓN REGIONAL DE LA INTERFAZ	31
DIAGNÓSTICO MOLECULAR	36
DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO	36

DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	46
RECOMENDACIONES	47
ABREVIATURAS	48
REFERENCIAS	50
ANEXO 1	63
Diagrama de la temperatura y humedad relativa registrada en Lerma, Estado de México durante las fechas de muestreo.	63
ANEXO 2	64
Información de localidades muestreadas del municipio de Lerma, Estado de México....	64
ANEXO 3	65
Colecta de muestras de cerdos de traspatio en granjas del municipio de Lerma, Estado de México.	65
ANEXO 4	66
Antígenos de virus de influenza utilizados durante la técnica de Inhibición de la Hemaglutinación.	66
ANEXO 5	67
Valores de Ct del control positivo, controles negativos y de las muestras nasales con hisopo (pool 1 al 32) analizadas por medio de qRT-PCR.....	67
ANEXO 6	68
Valores de Ct del control positivo, controles negativos y de las muestras nasales con hisopo (pool 33 al 39) analizadas por medio de qRT-PCR.....	68

LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1. Genes y proteínas del virus de influenza A.
- Cuadro 2. Componentes del kit y sus respectivos volúmenes para la preparación de la mezcla maestra de la qRT-PCR.
- Cuadro 3. Condiciones de amplificación de la qRT-PCR.
- Cuadro 4. Distancia lineal de las granjas al centroide de la Ciénega de Atarasquillo.
- Cuadro 5. Resultados del diagnóstico serológico de VIA en las granjas de cerdos de traspatio de Lerma, Estado de México.
- Cuadro 6. Promedio de títulos de anticuerpos hacia los subtipos H1N1 y H3N2 por granja.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Estructura del virus de influenza A.
- Figura 2. Curso de infección del VIA subtipo H1N1 y colecta de muestras para diagnóstico en porcinos.
- Figura 3. Prueba de inhibición de la hemaglutinación.
- Figura 4. Mapa del área de estudio.
- Figura 5. Distribución espacial de las granjas de traspatio muestreadas en Lerma, Estado de México.
- Figura 6. Granjas de traspatio localizadas a menos de 2 km de la Ciénega de Atarasquillo.
- Figura 7. Mapa representando la hidrología lítica y zonas susceptibles a inundación del municipio de Lerma, Estado de México.
- Figura 8. Actividad cinegética en la Ciénega de Atarasquillo (superior). Presencia de lancha de “patero” en una granja de traspatio de la región (inferior).
- Figura 9. Evidencia del contacto de cerdos y aves de traspatio en algunas granjas del municipio de Lerma, Estado de México.
- Figura 10. Gráfica de RT-PCR en tiempo real de muestras nasales con hisopo.
- Figura 11. Porcentaje de cerdos seropositivos a virus de influenza A por subtipo y por granja de traspatio.
- Figura 12. Porcentaje de cerdos de traspatio seropositivos a virus de influenza A por subtipo y fecha de muestreo.
- Figura 13. Resultado de sueros dobles positivos al subtipo H1N1 y H3N2 por granja expresados en log₁₀.

INTRODUCCIÓN

ANTECEDENTES

En los últimos 50 años la emergencia de enfermedades ha generado especial interés a nivel mundial. Sin embargo, el entendimiento de la dinámica y ecología de las enfermedades infecciosas en la interfaz animal doméstico - fauna silvestre continúa siendo limitado debido a la falta de vigilancia epidemiológica (Miller *et al.*, 2013). El 77% de los patógenos son capaces de infectar múltiples especies hospederas incluyendo animales silvestres (Wiethoelter *et al.*, 2015). Asimismo, el 60.3% de las enfermedades infecciosas emergentes son zoonóticas, de las cuales el 71.8% tienen un origen silvestre (Jones *et al.*, 2008). Las aves acuáticas de los órdenes Anseriformes y Charadriiformes son reconocidos como los principales reservorios naturales de virus de influenza A (VIA), ya que albergan a la mayoría de subtipos (H1-H16, N1-N9), con excepción de los subtipos H17N10 y H18N11 detectados recientemente en murciélagos (Joseph *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2014).

Los VIA infectan un gran rango de hospederos incluyendo equinos, caninos, aves de corral, cerdos y humanos. Estos virus continúan siendo una amenaza para la salud pública a nivel mundial debido principalmente a su potencial de transmisión interespecie (Joseph *et al.*, 2017). Uno de los ejemplos es la Gripe Española, pandemia producida por un virus de influenza AH1N1 de origen aviar, la cual se estableció en poblaciones porcinas en 1918, causó cerca de 50 millones de muertes en humanos y afectó al 30% de la población mundial (Netrabukkana *et al.*, 2016). Así mismo, el virus pandémico (H1N1pdm09) triple recombinante con linaje porcino norteamericano y euroasiático representa otro de los eventos de transmisión interespecie, el cual se ha establecido como endémico en las poblaciones porcinas alrededor del mundo (Munoz *et al.*, 2016; Netrabukkana *et al.*, 2016; Vincent *et al.*, 2014).

La transmisión interespecie y el surgimiento de re-arreglos virales se han asociado principalmente a interfaces de contacto entre animales y humanos (Neumann y Kawaoka, 2015; Osbjer *et al.*, 2016). Factores ambientales, ecológicos y socioeconómicos en su mayoría ligados a cambios antropogénicos han influido en la emergencia de brotes de VIA (Jones *et al.*, 2008). Asimismo, el crecimiento exponencial de la población humana y el consecuente incremento en la demanda de alimentos de origen animal han impulsado el

desarrollo de la producción animal, el aumento de la tasa de contacto entre especies silvestres domésticas y humanos, así como una eficiente transmisión de VIA (Daszak *et al.*, 2001; Osbjer *et al.*, 2016). Producciones familiares de traspatio con bajas medidas de bioseguridad y complejas interacciones entre diversas especies son reconocidas como factores clave en la emergencia y evolución de VIA a nivel mundial (Jimenez-Bluhm *et al.*, 2018; Osbjer *et al.*, 2016). Estos sistemas productivos se caracterizan en su mayoría por el autoconsumo y la baja densidad animal. Asimismo, representan zonas de alto riesgo para la transmisión de VIA especialmente si se hallan localizados dentro de ecosistemas con presencia de humedales debido a la congregación de gran cantidad de aves acuáticas y al incremento de las tasas de contacto entre o dentro de poblaciones de aves a lo largo de sitios de descanso y alimentación de aves migratorias (Bengtsson *et al.*, 2016; Short *et al.*, 2015). En el caso de México, el sistema de producción familiar representa hasta un 85% de la producción a nivel nacional, se encuentra asociado a prácticas culturales y constituye una fuente importante de alimento en regiones rurales (Gutiérrez-Ruiz *et al.*, 2012).

Del mismo modo, los cerdos han participado en la ecología y evolución de VIA a través de la historia (Crisci *et al.*, 2013). El virus de influenza A (H1N1) fue aislado por primera vez en cerdos en 1930 (Shope, 1931). Actualmente, los subtipos H1 y H3 circulan enzoóticamente en cerdos a nivel mundial, predominando el H1N1, H3N2 y H1N2 (Crisci *et al.*, 2013). La historia evolutiva de estos subtipos ha reflejado múltiples introducciones de virus de influenza humanos y aviares desde 1990 (Lewis *et al.*, 2016). Virus aviares de diferentes subtipos (H1N1, H3N2, H3N3, H4N6, H5N2 y H9N2) se han aislado en cerdos en diversas ocasiones, y se ha confirmado la susceptibilidad de cerdos a VIA aviares a nivel experimental (Lipatov *et al.*, 2008; Sánchez-Betancourt *et al.*, 2017; Yassine *et al.*, 2011).

Sin embargo, a pesar de la preocupación global por comprender procesos ligados a la evolución y epidemiología de VIA después del surgimiento del virus pandémico de influenza AH1N1 en el 2009 (Vincent *et al.*, 2014); así como la evidencia de circulación de VIA en cerdos, aves domésticas, patos silvestres migratorios y ambientes acuáticos en México (Barrón-Rodríguez *et al.*, 2018; Cuevas-Domínguez y González-Guzmán, 2009; Montalvo-Corral y Hernández, 2010; Ornelas-Eusebio *et al.*, 2015; Saavedra-Montañez *et al.*, 2013; Sánchez-Betancourt *et al.*, 2017), aún existen vacíos en la vigilancia de VIA en porcinos y

diversas especies animales tanto domésticas como silvestres, especialmente en áreas rurales.

AGENTE ETIOLÓGICO

Los virus de influenza son virus envueltos de genoma ARN segmentado, cadena sencilla y polaridad negativa. Estos virus pleomórficos de 80 a 120 nm pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*, y se clasifican actualmente en cuatro géneros: *Alphainfluenzavirus*, *Betainfluenzavirus*, *Gammainfluenzavirus* y *Deltainfluenzavirus* (ICTV, 2017). Los virus de influenza tipo A, especie del género *Alphainfluenzavirus*, se categorizan a su vez en diferentes subtipos basados en diferencias genéticas y antigénicas de sus glicoproteínas de superficie, la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA). El genoma viral es de aproximadamente 13.6 kb y consiste en 8 segmentos de ARN que codifican para 12-14 proteínas (Hulo *et al.*, 2011; Munoz *et al.*, 2016) (Cuadro y Figura 1).

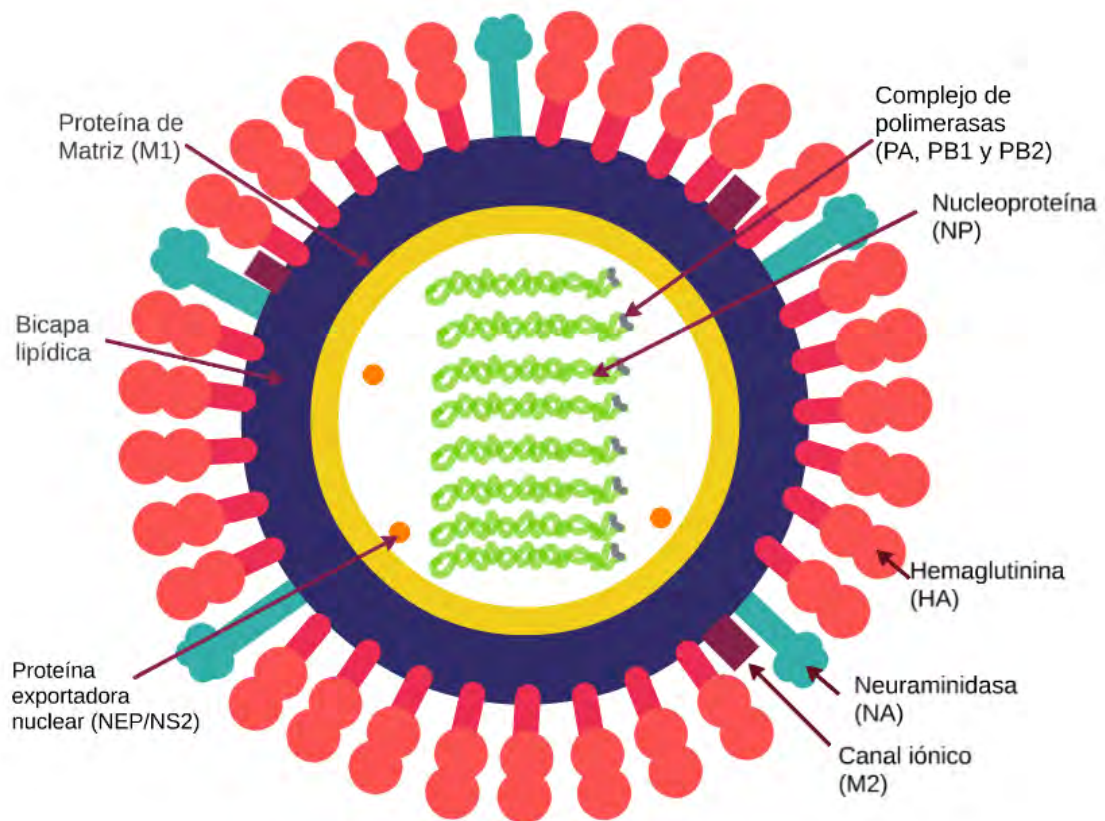


Figura 1. Estructura del virus de influenza A. Adaptado de: Hulo *et al.* (2011).

Cuadro 1. Genes y proteínas del virus de influenza. Adaptado de Munoz *et al.* (2016).

Gen	Segmento	Nombre de la proteína	Función de la proteína
1	Polimerasa Básica 2 (PB2)	Polimerasa Básica 2 (PB2)	Proteína interna, replicación viral. Síntesis de ARN viral
2	Polimerasa Básica 1 (PB1)	Polimerasa Básica 1 (PB1) PB1-F2	Proteína interna, replicación viral. Síntesis de ARN viral Actividad pro-apoptótica. Inducción de la respuesta proinflamatoria
3	Polimerasa Ácida (PA)	Polimerasa Ácida (PA)	Proteína interna, replicación viral
4	Hemaglutinina (HA).	Hemaglutinina (HA)	Glicoproteína de superficie. Determinante antigénico. Unión viral a receptores celulares. Fusión de la membrana viral y la membrana endosomal. Específica de subtipo
5	Nucleoproteína (NP)	Nucleoproteína (NP)	Proteína de la nucleocápside. Encapsidación. Recubrimiento de ARN. Transcripción de ARN. Específica de tipo
6	Neuraminidasa (NA)	Neuraminidasa (NA)	Proteína de superficie. Determinante antigénico. Liberación viral de las células huésped. Específica de subtipo
7	Matriz (M)	Matriz 1 (M1) Matriz 2 (M2)	Involucrada en la salida de las RNP virales del núcleo y en el empaquetamiento viral. Estabilidad de la proteína de membrana Canal de iones transmembrana. Acidificación del endosoma y liberación de las RNPs al citoplasma celular
8	No estructural (NS)	No estructural 1 (NS1) No estructural 2 (NS2) o Proteína Exportadora Nuclear (NEP)	Proteínas internas. Antagoniza la respuesta inmune innata Regulación del ciclo viral, especialmente en la transcripción del ARNm y la localización de proteínas ribonucleicas virales

Los virus de influenza A tienen una capacidad dinámica de modificar su rango de hospedero y virulencia a través de mutaciones puntuales y del reordenamiento de segmentos génicos (Balzli *et al.*, 2016). Existen dos mecanismos principales en la evolución antigénica del virus de influenza: la deriva antigénica (*Drift*) y el reordenamiento antigénico (*Shift*). La deriva antigénica se debe a mutaciones puntuales que resultan en cambios de aminoácidos en las proteínas de superficie HA y NA, así como en genes internos, lo cual conlleva a la alteración de los sitios antigénicos y en ocasiones a la evasión de la respuesta inmune. Mientras que, en el reordenamiento antigénico ocurre una redistribución de segmentos genéticos cuando dos o más virus infectan una misma célula, lo cual puede conducir a la generación de nuevas variantes virales (Wikramaratna *et al.*, 2013).

DINÁMICA DE TRANSMISIÓN DE VIRUS DE INFLUENZA

El virus de influenza A puede ser transmitido de su reservorio natural a numerosas especies como aves de corral, cerdos, humanos, entre otros animales. Este virus se transmite fácilmente a individuos susceptibles principalmente por contacto directo con secreciones de animales infectados o fómites contaminados (Joseph *et al.*, 2017). Se ha documentado que los cerdos con manifestaciones clínicas de la enfermedad o infectados subclínicamente son importantes en la transmisión de VIA dentro y entre granjas (Torremorell *et al.*, 2012). Asimismo, el agua contaminada con heces de aves infectadas ha sido implicada en brotes porcinos de origen aviar (Karasin *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2007). Lagos, lagunas y sedimentos de estanques pueden servir como reservorios de virus de influenza. Los VIA pueden persistir en cuerpos de agua hasta por 30 días (tres veces más que en heces), lo que los convierte en una fuente de contaminación a otras especies que comparten el mismo recurso. Esta viabilidad está influenciada por la temperatura, pH, salinidad, tipo de agua, entre otras características ambientales (Dalziel *et al.*, 2016).

Estudios previos mencionan el papel de la ruta aerógena en la dinámica de transmisión de virus de influenza A entre granjas porcinas (Torremorell *et al.*, 2012). También se ha reportado que el material genético de virus de influenza puede ser detectado en muestras de aire a una distancia de hasta 2.1 km de la producción porcina infectada (Corzo *et al.*, 2013). De igual manera, el comercio animal dado por el movimiento de porcinos está implicado en la diseminación espacial de VIA (Lebl *et al.*, 2016). Incluso, algunos insectos han llegado a ser propuestos como vectores mecánicos debido a la detección del subtipo

aviar H5N1 en mosquitos y moscas en granjas de aves de corral infectadas (Barbazan *et al.*, 2008; Sawabe *et al.*, 2006).

Los cerdos han estado implicados en diversos eventos de transmisión interespecie. Es importante destacar que esta transmisión depende de factores del virus, del hospedero y del ambiente (Harris *et al.*, 2017). En diversos estudios se hipotetizan al cambio de preferencia del receptor y a mutaciones en las proteínas de replicación como factores virológicos implicados en el cruce de barrera entre especies. Algunas mutaciones como: G226L, I55T, G186V y T160A en la HA de virus aviares confieren preferencia hacia receptores de ácido siálico α -2.6. De igual modo, mutaciones en las polimerasas como por ejemplo E627K en la PB2 se consideran importantes para la replicación de virus aviares en mamíferos (Munoz *et al.*, 2016).

Por otra parte, uno de los factores propios del hospedero es la presencia de receptores. Su distribución anatómica varía entre especies y entre los diferentes órganos de la misma especie. En el caso de porcinos, los receptores de ácido siálico se localizan principalmente en el tracto respiratorio superior (α -2,6 galactosa) y en el tracto respiratorio inferior (α -2,3 galactosa), aunque también han sido detectados en hígado, riñón, bazo, músculo esquelético, cerebro, intestino delgado y colon (Nelli *et al.*, 2010). En aves de corral se presentan ambos tipos de receptores en tracto respiratorio e intestino. Mientras que, en las aves acuáticas se presentan principalmente receptores α -2,3 en tráquea e intestino (Jourdain *et al.*, 2011; Pillai y Lee, 2010). Asimismo, otro factor del hospedero es el inmunitario, el cual es determinado por múltiples factores incluyendo la presencia de barreras naturales como la mucina que previenen la replicación viral, la vacunación o pre-infección del hospedero con virus homólogo y/o heterólogo (Munoz *et al.*, 2016).

Finalmente, dentro de los factores ambientales que influyen en la transmisión de VIA entre especies se encuentran: la carga viral (en aire o fómites), la forma de transmisión, la estabilidad del virus, el comportamiento del hospedero y las condiciones climáticas (Yassine *et al.*, 2010). De igual forma, prácticas como la ingestión de órganos de animales infectados, la proximidad a animales infectados, la cercanía de granjas a recursos acuáticos externos y campos de cultivo (Zhao *et al.*, 2018), así como el contacto directo/indirecto con heces de aves en sitios de descanso y alimentación, contacto y exposición con animales enfermos o

mueritos y proximidad a aves silvestres como patos acuáticos, se han descrito como factores epidemiológicos importantes en la propagación viral (Harris *et al.*, 2017).

DIAGNÓSTICO DE VIRUS DE INFLUENZA

Los signos clínicos, las lesiones microscópicas y macroscópicas son útiles para realizar un diagnóstico presuntivo en porcinos. De manera complementaria, la serología es una herramienta útil que permite la detección de anticuerpos en animales expuestos al virus, lo que la convierte en una opción diagnóstica viable debido al curso corto de la enfermedad. Sin embargo, el aislamiento viral o la detección de ácidos nucleicos virales son necesarios para un diagnóstico definitivo (Vincent *et al.*, 2014). El VIA comienza a ser excretado aproximadamente 24–48 horas post-exposición y continúa excretándose hasta los 5–8 días por vía nasal. Sin embargo existen variaciones en la excreción viral entre cepas (Takemae *et al.*, 2018). El diagnóstico para identificación viral debe efectuarse tan pronto como se desarrolle el curso de la enfermedad debido a la ocurrencia de picos de excreción nasal a los 3, 4 y 5 días post-infección. Mientras que, la presencia de inmunoglobulinas (predominantemente IgG) a niveles detectables ocurre dentro de 1–2 semanas post-infección, con un pico a las 4–7 semanas (Figura 2).

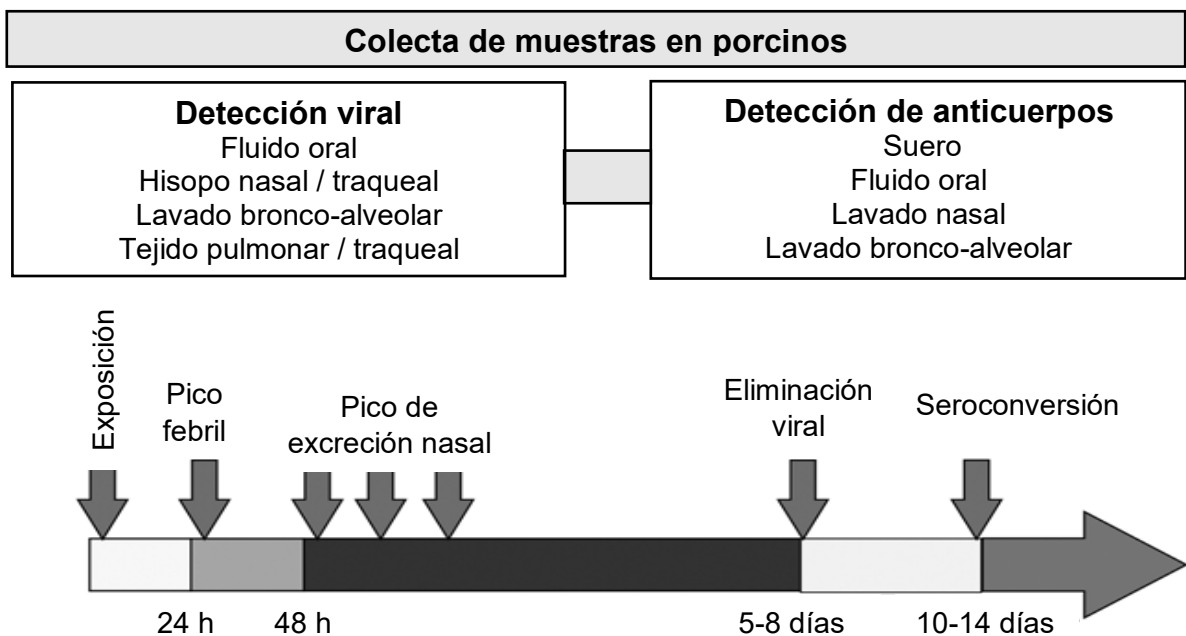


Figura 2. Curso de infección de VIA subtipo H1N1 y colecta de muestras para diagnóstico en porcinos. Fuente: Vincent *et al.* (2014).

Los procedimientos de diagnóstico de VIA según la Organización Panamericana de la Salud - OPS (2010) se clasifican en:

1. Diagnóstico virológico basado en detección del agente viral por aislamiento en huevos embrionados o cultivos celulares, detección del antígeno y amplificación de genoma viral por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR).
2. Diagnóstico serológico basado en la detección y medida de niveles de anticuerpos utilizando técnicas como: inhibición de la hemaglutinación (IH), ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y seroneutralización viral (SVN).

El aislamiento viral es considerado la prueba estándar para el diagnóstico de virus de influenza. Éste se puede realizar en huevos embrionados libres de patógenos específicos de 9 a 11 días, así como en diversas líneas celulares, de las cuales la línea celular de riñón de perro Madin-Derby (MDCK) tiene la mayor sensibilidad y es la más comúnmente usada en investigación para la mayoría de las cepas aviares y porcinas (Lombardo *et al.*, 2012; Lugovtsev *et al.*, 2013; Zhang y Gauger, 2014). Otra técnica menos costosa comparada con el aislamiento en embrión de pollo es la RT-PCR en tiempo real. La qRT-PCR es una prueba cuantificable, rápida, altamente sensible y específica dirigida hacia los genes de matriz y de la nucleoproteína de VIA, la cual se basa en copiar millones de veces una secuencia específica. Sin embargo, su principal desventaja es la falta de determinación de la viabilidad del ARN detectado (Zhang y Harmon, 2014). Asimismo, otra técnica como la Inmunohistoquímica (IHC) ha sido usada para el estudio de la patogénesis del VIA al permitir la identificación de sitios de replicación del virus en tejidos infectados congelados o fijados con formol usando diferentes anticuerpos y su correlación con cambios histopatológicos observados (Detmer *et al.*, 2012; Pantin-Jackwood, 2014).

En cuanto al diagnóstico serológico, la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (IH), es la prueba estándar reconocida por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), usada para clasificar o subtipificar virus hemaglutinantes como el de influenza (Pedersen, 2014). Asimismo, al ser cuantitativa es útil para evaluar las relaciones antigénicas entre diferentes aislados de virus de influenza del mismo subtipo. Este método sensible y específico se basa en la capacidad del virus para hemoaglutinar eritrocitos. Por lo cual, el

principio de la técnica es la interferencia en la unión de la HA viral con los receptores de los eritrocitos por anticuerpos específicos para la HA (Figura 3).

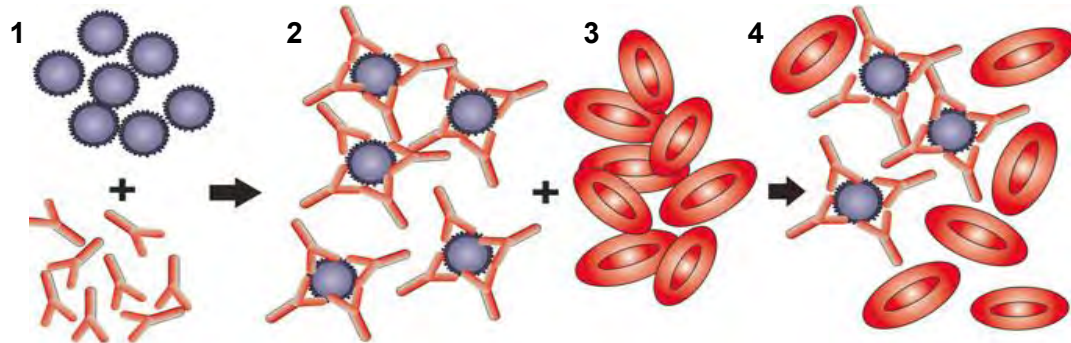


Figura 3. Prueba de inhibición de la hemaglutinación 1) Virus + anticuerpos en muestras de suero 2). Los anticuerpos se unen a la HA viral 3) Se agregan los eritrocitos 4) Los anticuerpos bloquean la unión virus-eritrocito (hemaglutinación). Fuente: Pedersen (2014).

Una técnica alternativa a la IH es la SVN. Esta prueba altamente sensible y específica detecta el nivel de anticuerpos protectivos o neutralizantes en una muestra de suero (Detmer *et al.*, 2012). Esta técnica tiene como ventaja la detección de anticuerpos funcionales que sugieren inmunidad protectora después de vacunación o infección. Igualmente, estos títulos obtenidos basados en la presencia o ausencia de efecto citopático en células MDCK generalmente se correlacionan con títulos obtenidos por la prueba de IH (Gauger y Vincent, 2014). Finalmente, otra técnica para detectar anticuerpos anti-influenza específicos es la ELISA indirecta, la cual usa VIA como antígeno, así como anticuerpos dirigidos contra IgG e IgA conjugados con una enzima que cataliza una reacción de cambio de color. Esta técnica cuenta con una mayor sensibilidad, aunque es más compleja de realizar (Gauger *et al.*, 2014).

ECOLOGÍA DEL VIRUS DE INFLUENZA EN CERDOS DOMÉSTICOS

Los cerdos han sido descritos como hospederos intermediarios para la transmisión de virus de influenza entre reservorios silvestres y otras especies de mamíferos debido a la presencia de receptores de ácido siálico unido a residuos de galactosa por enlace α -2,3 y α -2,6 distribuidos en las células epiteliales del tracto respiratorio. Asimismo, se consideran importantes reservorios de diversidad genética viral (Nelson *et al.*, 2015). Desde principios del siglo XX se ha evaluado la potencial transmisión de VIA de origen aviar a cerdos

domésticos y humanos (Kida *et al.*, 1994). El papel que desempeñan los cerdos en el intercambio de genes de VIA entre especies se ha demostrado desde 1979 con la transmisión y el establecimiento de virus de origen aviar en cerdos y su posterior re-arreglo con virus de origen humano (Donatelli *et al.*, 2016). Asimismo, datos epidemiológicos sugieren a los cerdos como la fuente más probable de infección por el subtipo H3N2 en humanos (Neumann y Kawaoka, 2015).

Los cerdos son naturalmente susceptibles a la infección por los subtipos H1N1 humano y aviar, H3N2 recombinante y H1N2 (Sánchez-Betancourt *et al.*, 2017). Sin embargo, también presentan susceptibilidad a un gran rango de virus de influenza de manera experimental. Cerca de 29 a 38 virus aviares se replican en cerdos sin presentación de signos clínicos (Balzli *et al.*, 2016; Peiris *et al.*, 2001). De igual manera, virus de influenza aviar de alta patogenicidad (HPAI): H7N7 y H5N1, así como subtipos de baja patogenicidad (LPAI): H1N1, H3N1, H4N6, H5N2, H6N6, H7N2, H4N8, H5N1, H4N1 y H9N2 se han aislado en cerdos alrededor del mundo (Baudon *et al.*, 2017; De Vleeschauwer *et al.*, 2009a; Sánchez-Betancourt *et al.*, 2017).

Los datos de aislamientos de virus H5N1 en cerdos son muy limitados (Lipatov *et al.*, 2008). Estudios epidemiológicos de Estados Unidos de América, China, Vietnam y Tailandia reportan baja seroprevalencia para el subtipo H5N1 en porcinos, así como una leve susceptibilidad a la infección por H5N1 altamente patógeno con capacidad de replicación únicamente en tracto respiratorio, falta de transmisibilidad por contacto de cerdo a cerdo y ausencia de infección sistémica (Cao *et al.*, 2013; Choi *et al.*, 2005; Lipatov *et al.*, 2008). Sin embargo, se ha detectado exposición natural a virus HPAI H5N1 en cerdos domésticos aparentemente sanos en cercanía a aves de corral infectadas en sitios de Nigeria e Indonesia. Esta ausencia de signos clínicos podría indicar replicación del virus durante largos períodos de tiempo sin ser detectada, lo que podría facilitar la adaptación viral en hospederos mamíferos (Meseko *et al.*, 2018; Nidom *et al.*, 2010).

Junto con el subtipo H5N1 cuya ocurrencia se asocia con pérdidas socioeconómicas y zoonóticas (A. Ssematimba *et al.*, 2018); existe evidencia virológica de infección y seroconversión con el subtipo H9N2 (Gomaa *et al.*, 2018; Hu *et al.*, 2012), subtipo enzoótico en aves de corral de varios países asiáticos y del Medio Oriente, el cual posee una persistente amenaza de pandemia en humanos. Desde finales de 1990, virus aislados en

cerdos se han relacionado genéticamente con virus H9N2 de aves locales, sugiriendo a las aves de corral como fuentes de infección (Wang *et al.*, 2016). Aunque la transmisión de este subtipo entre cerdos es limitada, bajo condiciones experimentales, se ha demostrado que reordenamientos con el subtipo H3N2 y el virus pandémico AH1N1 (H1N1pdm) pueden incrementar su replicación y transmisibilidad entre cerdos (Mancera Gracia *et al.*, 2017).

De igual manera, tres virus aviares H4 han sido reportados en cerdos infectados naturalmente (Abente *et al.*, 2017). Primero, un subtipo H4N6 en Canadá, China y Estados Unidos de América (Abente *et al.*, 2017; Karasin *et al.*, 2000); subtipo viral que se replica en pulmones, causa leves lesiones pulmonares y puede transmitirse de cerdo a cerdo pero no replicarse en el tracto respiratorio superior (Abente *et al.*, 2017). Además, este subtipo es el más común en patos silvestres y ha sido detectado naturalmente en granjas porcinas cercanas a lagos o lagunas donde se congregan gran cantidad de aves acuáticas migratorias y residentes cada año (Abente *et al.*, 2017; Karasin *et al.*, 2000). Segundo, un subtipo H4N1 aislado en un cerdo en China central, cuyos genes provienen de diferentes virus aviares, lo cual sugiere que las aves migratorias desempeñan un papel importante en su dispersión (Hu *et al.*, 2012). Y tercero, el subtipo H4N8 con un segmento de H5N1 aviar detectado en una granja comercial porcina del sureste de China (Su *et al.*, 2012).

Adicionalmente, se ha reportado el aislamiento y caracterización del subtipo H3N1 en cerdos de Corea, el cual puede replicarse en hospederos mamíferos sin adaptación y causar enfermedad clínica (Shin *et al.*, 2006). De igual manera este subtipo ha sido detectado en Estados Unidos de América con el gen de la hemaglutinina de un H3N2 de pavo doméstico (*Meleagris gallopavo*), el de la neuraminidasa de un H1N1 humano y los genes remanentes de virus porcinos, según análisis filogenéticos, lo que indica la transmisión interespecie entre pavos y cerdos (Lekcharoensuk *et al.*, 2006). Por lo cual, aunque el salto entre especies de virus de influenza raramente llega a establecerse en cerdos, es evidente la susceptibilidad y la capacidad replicativa que muestran los virus de influenza aviares dentro de poblaciones porcinas (Nelson *et al.*, 2015).

INFLUENZA EN PORCINOS DE MÉXICO

En México la Influenza porcina, excepto los subtipos H1N1 y H3N2, se encuentra en el grupo 1 de notificación inmediata obligatoria a las dependencias oficiales de salud animal

(SAGARPA, 2016). Se han realizado estudios serológicos contra el virus de influenza en diversos sistemas de producción en el país, incluido el sistema de traspatio. Álvarez *et al.* (2004) reportaron presencia de anticuerpos contra los subtipos H1N1 (8.3%) y H3N2 (65.1%), así como una co-circulación de ambos subtipos en el 66% de los sueros porcinos en el estado de Yucatán. Posteriormente, Jiménez Nápoles (2006) reportó una seroprevalencia del 55% contra el serotipo H3N2 en cerdos de engorda de producciones de traspatio de diversos estados de la República Mexicana. Asimismo, un estudio realizado por Saavedra-Montañez *et al.* (2013) con 2,094 muestras de suero obtenidas de los años 2000 a 2009 en porcinos de granjas de traspatio de la Ciudad de México, evidenció una mayor seroprevalencia al subtipo swH1N1 (74%), seguido por el swH3N2 (24.2%) y el hH1N1 (1.3%). De igual manera, durante los años 2008-2009, se reportó una seropositividad del 55% al subtipo H1N1, 59% al subtipo H3N2 y 38% a ambos subtipos en 150 cerdos provenientes de 15 granjas comerciales en el Estado de Sonora (López-Robles *et al.*, 2014).

Asimismo, Tufiño (2013) evidenció una frecuencia del 45.7% de anticuerpos para el subtipo H1N1 endémico, 20.4% para el H3N2 y 13.2% para el A/H1N1/2009 en los estados de Guanajuato, San Luis Potosí, Querétaro, Michoacán y Jalisco en sistemas de producción tecnificado, semitecnificado y de traspatio. En el año 2016, los subtipos H3N2 y H1N2 fueron descritos como ampliamente distribuidos en el Bajío Mexicano, con una seroprevalencia de 54.76% y 26.74%, respectivamente. De igual manera se evidenció su co-circulación en Jalisco, Guanajuato, Michoacán e Hidalgo (Sánchez-Betancourt *et al.*, 2017). Mientras que, en el Estado de México se evidenció una seroprevalencia del 33.33% contra el subtipo H3N2 y de 0% contra el subtipo H1N2 (Sánchez-Betancourt *et al.*, 2017).

Poco se ha reportado sobre el diagnóstico molecular de VIA a nivel nacional. Sin embargo, López-Robles *et al.* (2014) mencionan una prevalencia del 16.6% en granjas comerciales del Noreste de México. Asimismo, aunque existe poca información sobre la circulación de virus aviares en porcinos, en el año 2015 se reportó el aislamiento de un subtipo H5N2 (A/Swine/México/EdoMex/DMZC03/2015/H5N2) en cerdos del Estado de México y se describió su dinámica de infección y cuadro clínico de manera experimental en porcinos (Maya, 2017).

INFLUENZA EN LA INTERFAZ FAUNA SILVESTRE – ANIMAL DOMÉSTICO

Los animales silvestres contribuyen en la introducción, reintroducción y mantenimiento de patógenos en un área determinada (Pearson *et al.*, 2016). Caracterizar la interfaz entre animales domésticos y silvestres se ha constituido como una herramienta esencial para el control de las enfermedades infecciosas emergentes (Cappelle *et al.*, 2011). El entender como los animales usan su ambiente y su repercusión en las interacciones entre especies, permite determinar el riesgo local de transmisión y de mantenimiento de un agente infeccioso (Barasona *et al.*, 2014). Sin embargo, las interacciones en esta interfaz son difíciles de caracterizar y frecuentemente el riesgo de transmisión sólo se puede estimar usando medidas como la tasa de contacto (Cappelle *et al.*, 2011). Algunos parámetros tales como presencia y número de animales silvestres alrededor de granjas porcinas, acceso de estos a fuentes de comida o agua, y proximidad de la fauna silvestre a los cerdos domésticos tienen gran influencia sobre la probabilidad de exposición a un patógeno (Pearson *et al.*, 2016). Así mismo, la presencia de cuerpos de agua en un ecosistema se ha relacionado con una mayor interacción espacial entre especies (Barasona *et al.*, 2014; Desvaux *et al.*, 2011).

En el caso de virus de Influenza, existe un gran riesgo de transmisión en varias interfaces debido a la capacidad que este virus tiene para infectar múltiples especies hospedadoras y de evolucionar rápidamente por su alta tasa de mutación genética (Lauterbach *et al.*, 2018). En la interfaz humano-ave la infección por subtipos aviarios H5N1 y H7N9 en China se ha asociado frecuentemente con el contacto de humanos con aves de corral en mercados de aves vivas (Chen *et al.*, 2015). De igual manera, en la interfaz humano-cerdo, los subtipos de VIA que circulan endémicamente en porcinos se han encontrado en humanos después del contacto con animales infectados (Netrabukkana *et al.*, 2016). Así mismo, en la interfaz ave silvestre-ave doméstica y ave doméstica-mamífero, las producciones de traspatio con mezcla de patos, gansos, pavos con otras especies domésticas han facilitado la emergencia de patógenos y el intercambio de VIA (Donatelli *et al.*, 2016). Sin embargo, vacíos de información prevalecen en la interfaz cerdo-fauna silvestre; en la cual, según lo reportado por Wiethoelter *et al.* (2015), sólo 18% de 80,000 publicaciones científicas sobre enfermedades entre fauna silvestre y ganado han abordado este componente comparado con otras interfaces.

JUSTIFICACIÓN

La vigilancia epidemiológica del virus de influenza tanto en humanos como en animales es de crítica importancia debido a su impacto en salud pública y a las repercusiones económicas que representa. En particular, los sistemas productivos de traspatio con gran proximidad entre diversas especies animales son un factor determinante en la evolución viral. Recientemente, se reconoce que la co-circulación de múltiples subtipos de virus de influenza A en aves, porcinos y humanos, y la transmisión ocasional de variantes aviarias en poblaciones porcinas constituyen un riesgo para la emergencia de nuevos subtipos virales, los cuales podrían tener potencial pandémico. Esta transmisión de virus de influenza se produce comúnmente por contacto con aves infectadas y ocurre en función de los hábitats que comparten los animales domésticos y la fauna silvestre. Por lo tanto, caracterizar la región de interfaz con base en la convergencia espacial y temporal entre diversas especies animales, así como, evaluar molecular y serológicamente la frecuencia de VIA en cerdos de traspatio es clave para el entendimiento de la dinámica de transmisión viral en dicha interfaz.

HIPÓTESIS

La convergencia temporal y espacial que ocurre en la interfaz entre unidades de producción porcina de traspatio y la migración de aves acuáticas favorece la diversificación de virus de influenza en cerdos.

OBJETIVO GENERAL

Efectuar diagnóstico molecular y serológico de virus de influenza A en cerdos de traspatio en una interfaz con patos silvestres en el Municipio de Lerma, Estado de México.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar la región de interfaz entre los sistemas de producción de cerdos de traspatio y los sitios de descanso y alimentación de aves migratorias mediante la realización de análisis espaciales a nivel de paisaje.
- Realizar diagnóstico molecular de virus de influenza A en muestras nasales de cerdos mediante qRT-PCR.
- Identificar la presencia de anticuerpos de virus de influenza A en sueros porcinos mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación.

MATERIAL Y MÉTODOS

ÁREA DE ESTUDIO

El estudio fue realizado en el municipio de Lerma, Estado de México (19°13' – 19° 26' latitud norte, 99°22' – 99°34' longitud oeste) (Figura 4). La temperatura y humedad promedio del área de estudio durante la temporada invernal fue de 13°C (máx 21°C, min 4°C) y 57% (máx 87%, min 26%), respectivamente (Anexo 1). Las unidades de estudio fueron granjas de traspatio localizadas dentro de un radio de 6 km del centroide de la Ciénega de Atarasquillo (Chiconahuapan), la cual forma parte de las Ciénegas de Lerma y cuenta con una extensión de 346 ha. Esta Área Natural Protegida (ANP) es un área de importancia para la conservación de aves (AICA) y hábitat prioritario para aves acuáticas residentes y migratorias (Zepeda Gómez *et al.*, 2012). Las granjas pertenecieron a las localidades de Pueblo Nuevo Tlalmimilolpan, Colonia Reforma Tlalmimilolpan, Santa María Tlalmimilolpan, Casa Blanca (Tierras nuevas), Ejido de San Lorenzo Huitzilapan y Santa María Atarasquillo (Anexo 2).

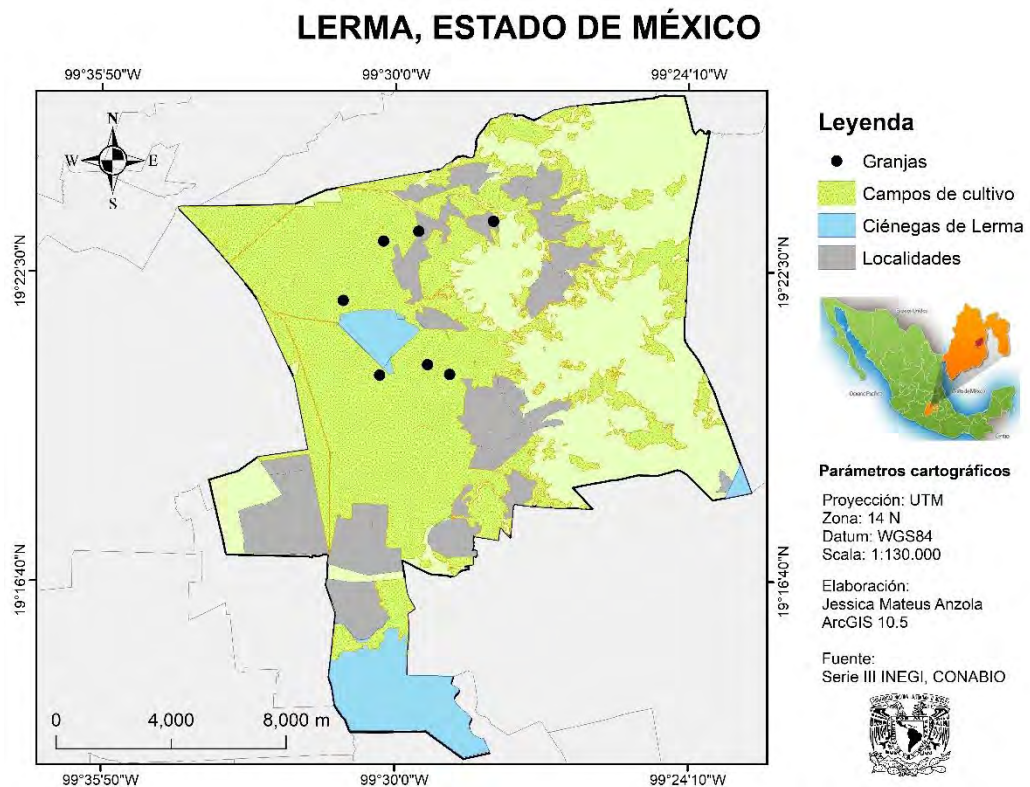


Figura 4. Mapa del área de estudio.

CARACTERIZACIÓN REGIONAL DE LA INTERFAZ

Se caracterizó la región mediante el uso de metadatos de Áreas Geoestadísticas Municipales, 2015 (INEGI, 2016), metadatos de Áreas Naturales Protegidas Federales de México (SEMARNAT-CONANP, 2017), metadatos de Hidrología Lógica del Estado de México (Casa, 2002) y metadatos del Conjunto de Datos Vectorial Edafológico, escala 1:250 000 Serie II (INEGI, 2014) disponibles en el portal de Geoinformación de CONABIO (<http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/>). Asimismo, se incluyó información topográfica escala 1:50 000 serie III (INEGI, 2017), información obtenida de las granjas de traspatio y de datos reportados por investigadores en estudios previos. Se recabaron las coordenadas geográficas de cada granja y se analizaron con respecto a la presencia de zonas sujetas a inundación, presencia de corrientes superficiales de agua, distancia de las granjas al centroide de la ciénega y distancia granja a granja. Los análisis espaciales fueron realizados mediante el programa ArcGIS versión 10.5 (ESRI, 2011).

COLECTA DE MUESTRAS

Los procedimientos realizados en el estudio fueron aprobados por el Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (SICUAE) con el protocolo N°2017/2-5. La toma de muestras se realizó de diciembre de 2016 a mayo de 2017, período que incluye la temporada invernal 2016-2017, en la cual arriban aves acuáticas migratorias procedentes de Estados Unidos de América y Canadá (Anexo 3). Según el “Censo Agrícola, Ganadero y Forestal 2007” existen 7,457 cerdos de 552 granjas, 260 de ellas de traspatio en el Estado de México (INEGI, 2007). Sin embargo, se desconoce el total de la población porcina de traspatio en el municipio de Lerma y la prevalencia de influenza en la región; por lo cual, el muestreo fue conforme a la participación voluntaria de los productores (muestreo por conveniencia).

Se realizó la toma de muestras nasales con hisopo a 175 cerdos pertenecientes a siete granjas de traspatio mediante el uso de hisopos de rayón utilizando uno por animal, siguiendo las recomendaciones de la OPS (2010). El hisopo se insertó en la cavidad nasal paralelo al paladar en dirección dorsomedial evitando tocar la piel, se retiró lentamente con movimientos circulares frotando la mucosa nasal, usando el mismo para coleccionar la muestra de la otra cavidad. Posteriormente, la muestra se depositó en microtubos de 1.5 ml estériles

con Medio Mínimo Esencial de Eagle (EMEM), previamente etiquetados. Las muestras se mantuvieron refrigeradas entre 2–8°C mientras fueron transportadas al área de procesamiento de muestras del Departamento de Etología, Fauna Silvestre y Animales de Laboratorio (DEFSAL) donde se mantuvieron a -20°C durante un día. Finalmente fueron almacenadas a -70°C en la Unidad de Investigación de la FMVZ-UNAM hasta su análisis. De igual manera, se colectaron 115 muestras sanguíneas de cerdos por punción de la vena yugular, las cuales se depositaron en tubos libres de anticoagulante (*Vacutainer*®). Se centrifugaron a 1500 rpm por 10 minutos (centrifuga *Sorvall*™ ST 16R, rotor TX-400) para la obtención de suero y se conservaron a -20°C en alícuotas de 2 ml en el DEFSAL de la FMVZ-UNAM hasta su posterior análisis.

EXTRACCIÓN DE ARN

Las muestras nasales con hisopo fueron descongeladas gradualmente y centrifugadas a 2500 rpm durante 5 minutos (mini centrifuga “Dlab” D2012 plus, rotor A12-2P); posterior a ello se tomaron 100 µL del sobrenadante de cada una de las muestras y se depositaron en un nuevo microtubo estéril para realizar *pools* de 4 o 5 animales para cada una de las granjas, obteniéndose un volumen final de 400-500 µL y un total de 39 *pools*. Subsecuentemente, en la Unidad de Investigación de la FMVZ-UNAM, se efectuó la extracción de ácidos nucleicos mediante la utilización de equipo automatizado (*QIAcube*® HT, *QIAGEN*). Se ocupó un volumen inicial de 200 µL del sobrenadante de cada uno de los *pools* y se empleó el kit comercial “*Cador*® *Pathogen 96 QIAcube*® HT Kit” (*QIAGEN*), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Posterior a ello, se realizó la preparación de la qRT-PCR con el sistema *QIAgility*® (*QIAGEN*).

RT- PCR EN TIEMPO REAL

En la Unidad de Investigación de la FMVZ-UNAM se llevó a cabo la qRT-PCR utilizando el *Rotor Gene Q*® (*QIAGEN*) dirigido hacia los genes de matriz y nucleoproteína, usando el kit comercial: “*VetMAX*™-*Gold SIV Detection Kit*” (*Life Technologies*). Este kit cuenta con una sensibilidad del 98.4% y una especificidad de 99.1%. El procedimiento se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante de la siguiente manera:

Se preparó la mezcla maestra para las 175 muestras, así como para el control positivo proporcionado por el kit y los controles negativos (control sin templado-NTC, agua libre de nucleasas) con las proporciones mostradas en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Componentes del kit y sus respectivos volúmenes para la preparación de la mezcla maestra de la qRT-PCR.

Componente	Volumen por reacción
<i>2X Multiplex RT-PCR Buffer</i>	12.5 µL
<i>Multiplex RT-PCR Enzyme Mix</i>	2.5 µL
<i>Influenza Virus Primer Probe Mix</i>	1.0 µL
Agua libre de nucleasas	1.0 µL
Volumen total	17.0 µL

Posteriormente, se colocaron 17.0 µL de la mezcla en cada microtubo de 0.2 ml y se le agregaron 8.0 µL de las muestras de extracción de ARN a procesar. Las condiciones de amplificación se presentan en el cuadro 3.

Cuadro 3. Condiciones de amplificación de la qRT-PCR.

Etapa	Ciclo	Temperatura	Tiempo
Transcripción reversa	1	48 °C	10 minutos
Inactivación RT/Desnaturalización inicial	1	95 °C	10 minutos
Amplificación	40	95 °C	15 segundos
		60 °C	45 segundos

El valor de ciclo umbral o Ct del control positivo se estableció en un rango de 25 a 29. Las muestras con un valor Ct menor a 38 fueron consideradas positivas y con un valor de Ct 38 a 40 fueron consideradas sospechosas (Choi *et al.*, 2015). Las qRT-PCR se realizaron por duplicado. Las muestras sospechosas se repitieron de manera individual.

REPLICACIÓN DE ANTÍGENOS VIRALES

En el laboratorio del DMZC se llevó a cabo la replicación del VIA (subtipos H1N1, H3N2 y H5N2) aislados de patos silvestres del área de estudio durante la temporada invernal 2016 – 2017. Estos fueron obtenidos y secuenciados como parte del proyecto PAPIIT IA-205916 (datos no publicados - Anexo 4). La replicación fue realizada en embriones de pollo libres de patógenos específicos de 9 a 11 días, siguiendo el siguiente procedimiento:

- Se revisó la viabilidad de los embriones. Se descartaron los muertos y débiles.
- Con un lápiz se delimitó la cámara de aire y se marcó la posición del embrión. Los embriones se incubaron por 24 h.
- Se señaló el sitio de inoculación 5 mm arriba de la cámara de aire y del lado contrario al embrión. Se desinfectó con alcohol al 70%. Se perforó el cascarón y se inoculó la cavidad alantoidea con 200 µL de virus, usando una jeringa de insulina a 90° (se inocularon 3 embriones por cada subtipo viral). El virus fue previamente filtrado con filtro *Millipore*TM de 0.22 µm. Se selló el orificio con pegamento blanco, se rotularon con el número de la muestra inoculada y se incubaron a 37 ± 2°C durante 72 h.
- Los embriones se revisaron a las 24, 48 y 72 h. Una vez muertos o finalizadas las 72 h, se colocaron en refrigeración mínimo 2 h con la finalidad de sacrificarlos.
- Después de las 72 h, se desinfectaron con alcohol al 70%, se retiró el cascarón por la línea marcada previamente para la obtención de líquido alantoideo con puntas estériles de 1000 µL y se depositó en tubos estériles de 15 ml de manera individual.
- El líquido se centrifugó a 3500 rpm (centrifuga *Sorvall*TM ST 16R, rotor TX-400) a 4°C durante 10 minutos.

TITULACIÓN VIRAL

Los líquidos alantoideos colectados fueron titulados por la técnica de Hemaglutinación en placas de 96 pozos. Se depositaron 50 µL de Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS) en todos los pozos de una placa en fondo “U”. Posteriormente, se colocaron 50 µL del líquido alantoideo recolectado de cada embrión en el pozo uno (por duplicado) y se realizaron diluciones dobles seriadas. Se depositaron 50 µL de eritrocitos de ave al 0.5% en toda la placa, realizando la lectura una vez el control de eritrocitos sedimentó. El título viral se ajustó a 8 Unidades Hemaglutinantes (UHA) para realizar la técnica de IH.

INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN

Se llevó a cabo la evaluación serológica mediante la prueba de IH método Beta (virus constante, suero diluido) contra los tres subtipos de VIA aislados en patos silvestres del área de estudio siguiendo los protocolos de la OIE (2017). Los sueros fueron inactivados a 56°C por 30 minutos y adsorbidos con caolín para remover inhibidores inespecíficos de la hemaglutinina y aglutininas del suero. En un nuevo tubo de 1.5 ml estériles se depositaron 200 µL de suero, 400 µL de caolín y 400 µL de eritrocitos de ave al 5% y se dejaron en refrigeración 24 h, tiempo en el cual el caolín y los eritrocitos de aves sedimentaron. Posteriormente, los sueros se centrifugaron a 1500 rpm por 10 min (centrifuga *Sorvall*TM ST 16R, rotor TX-400) y se realizó la prueba de IH con los sobrenadantes bajo el siguiente procedimiento en microplacas de 96 pozos.

- Se colocaron 50 µL de PBS en todos los pozos de la microplaca en fondo “U”.
- Se depositaron 50 µL de cada uno de los sueros (por duplicado) de la columna “1A” a la “12A” de la microplaca.
- Se realizaron diluciones dobles seriadas de la fila “A” a la “H”.
- Se agregaron 50 µL de cada antígeno viral (subtipos H1N1, H3N2 y H5N2) con una concentración de 8 UHA en todos los pozos, a excepción de la primera fila de cada microplaca (control de suero). Asimismo, se dejó un control de virus (50µL de PBS + 50 µL de antígeno H1N1, H3N2 y H5N2).
- Las placas se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Se agregaron 50 µL de eritrocitos de pollo al 0.5% en toda la microplaca. Se consideró un control de eritrocitos (50 µL de PBS + 50 µL de eritrocitos al 0.5%).
- Las placas se incubaron a temperatura ambiente hasta que el control de eritrocitos sedimentó.
- Se realizó la lectura de las placas.

El título de cada suero se consideró según el último pozo con sedimentación. Títulos mayores o iguales a 1:80 se consideraron positivos (Saavedra-Montañez *et al.*, 2013). Los títulos fueron transformados a logaritmo base 10 para su análisis. Asimismo, mediante el coeficiente de correlación de Spearman, se calculó la correlación entre el valores de seropositividad de las granjas por subtipo con las distancia de éstas hacia la ciénega usando el programa libre R versión 3.3.3 (R Development Core Team, 2017).

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN REGIONAL DE LA INTERFAZ

Las siete granjas muestreadas se encontraron a una distancia menor de 6 km de la Ciénega de Atarasquillo. El 60.6% de los cerdos muestreados pertenecían a tres granjas (N° 1, 2 y 7) localizadas a menos de 2 km del centroide y de la orilla de la Ciénega (Figura 5 y 6). La distancia lineal mínima y máxima de las granjas al centroide de la Ciénega fue de 1,455 y 5,558 m, respectivamente (Cuadro 4).

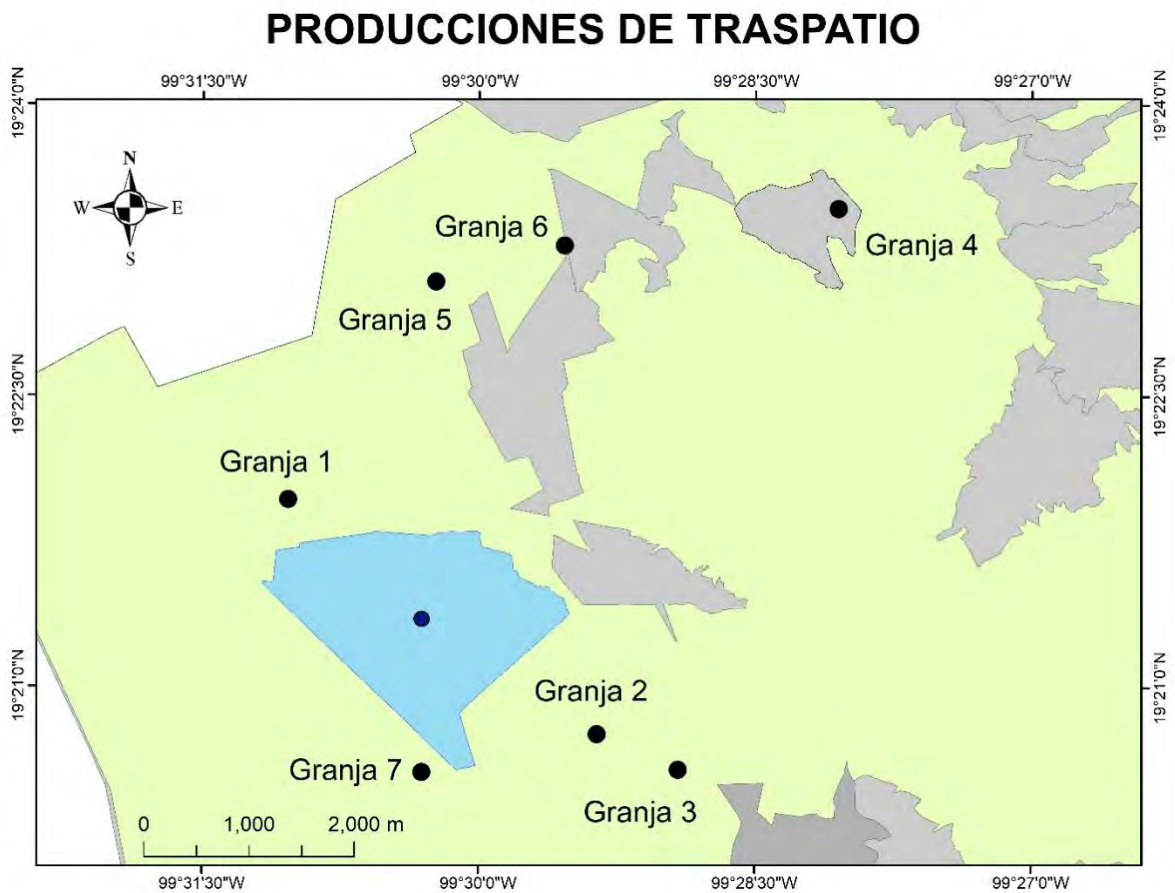


Figura 5. Distribución espacial de las granjas de traspatio muestreadas en Lerma, Estado de México. Color azul y gris representa la Ciénega de Atarasquillo y áreas urbanas, respectivamente.



Figura 6. Granjas de traspatio localizadas a menos de 2 km de la Ciénega de Atarasquillo.

Cuadro 4. Distancia lineal de las granjas al centroide de la Ciénega de Atarasquillo.

Granja	Distancia a centroide de Ciénega (m)	Granja	Distancia a centroide de Ciénega (m)
N°1	1,703	N°5	3,799
N°2	1,993	N°6	3,207
N°3	2,827	N°7	1,455
N°4	5,558		

Las granjas N° 2 y 7 se localizaron en una zona susceptible de inundación. El resto de las producciones porcinas de traspatio se encontraron cerca de pequeñas corrientes superficiales de agua como acueductos, canales y corrientes intermitentes (Figura 7).

HIDROLOGÍA Y ZONAS SUSCEPTIBLES A INUNDACIÓN

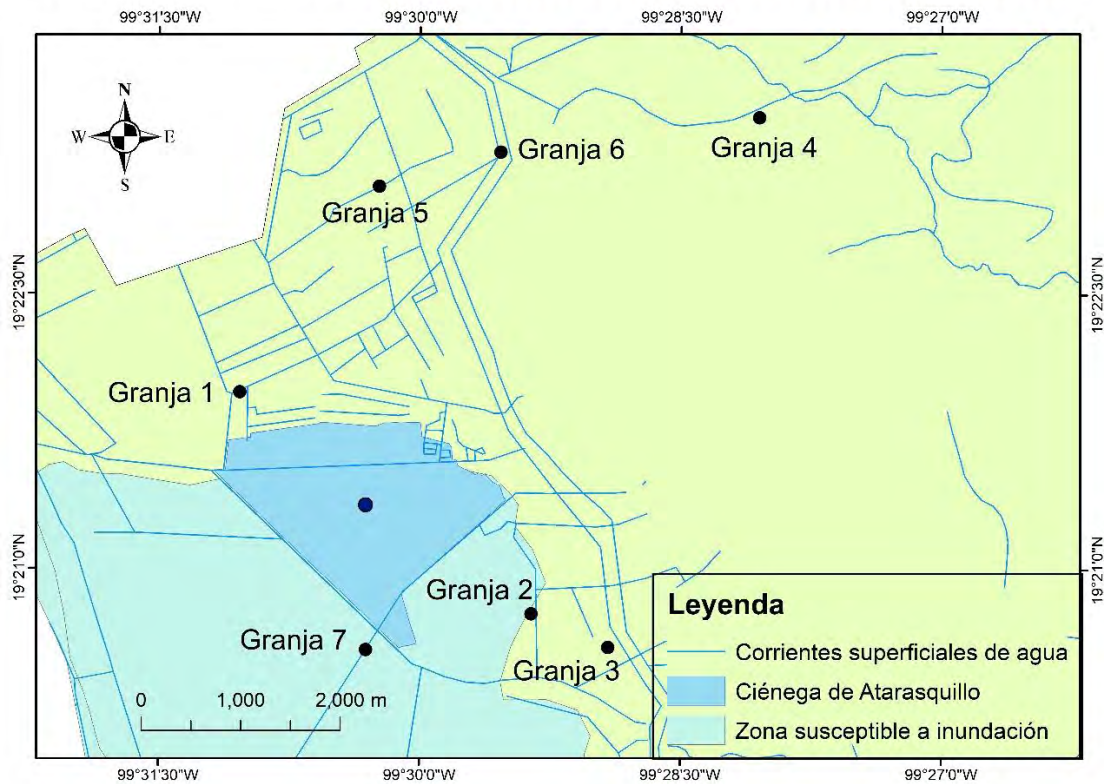


Figura 7. Mapa representando la hidrología lítica y zonas susceptibles a inundación del municipio de Lerma, Estado de México.

En la Ciénega se llevan a cabo actividades cinegéticas en las temporadas invernales que propician la interacción entre patos silvestres, cazadores y “pateros” (personas encargadas de ayudar a los cazadores especialmente en su introducción a la zona de caza y recolección de los patos silvestres cazados en el humedal). Cerca del 88.37% de las personas involucradas en la actividad cinegética y 20% de las personas de la región consumen los patos silvestres de manera regular. Asimismo, 53% de ellas cuenta con animales domésticos o de producción en su vivienda (Ochoa Vallejo, 2010) (Figura 8).



Figura 8. Actividad cinegética en la Ciénega de Atarasquillo (superior). Presencia de lancha de “patero” en una granja de traspatio de la región (inferior).

El 85.7% de las granjas (N° 3, 5, 6 y 7) se localizaron a menos de 2 km (0.8 - 1.7 km) de otra granja. La granja N° 2 tenía dos granjas a menos de 2 Km de distancia en línea recta. La máxima distancia lineal a otra granja de cerdos fue de 2.7 Km. En todas las granjas hubo presencia de aves de traspatio, excepto en la granja N° 5. Los propietarios de las granjas N° 1 y 2 fungen como médicos veterinarios de las otras granjas. Todos los porcicultores a excepción de la granja N° 6 reportaron contacto directo de los cerdos con las aves domésticas, las cuales se encuentran libremente en los corrales con acceso a bebederos y comederos (Figura 9). De igual manera, los propietarios reportan avistamiento de aves silvestres como pájaros, garcetas, garzas, cernícalos, búhos, águilas, zopilotes, lechuzas, cuervos y tordos en la zona, pero no contacto directo con aves acuáticas de la Ciénega.



Figura 9. Evidencia del contacto de cerdos y aves de traspatio en algunas granjas del municipio de Lerma, Estado de México.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Se obtuvieron resultados negativos en los 39 *pools* de muestras nasales con hisopo procesados (Figura 10). En la qRT-PCR del *pool* 1 al 32, el valor Ct del control positivo fue de 25.03. En el *pool* 11 se obtuvo un valor de Ct de 38.69 (sospechoso), pero no se observó amplificación de este de manera individual (Anexo 5). Asimismo, en la qRT-PCR del *pool* 33 al 39 el valor Ct del control positivo fue 25.1 y no se detectó ningún valor Ct en las muestras (Anexo 6). Las qRT-PCR se realizaron por duplicado para corroborar los resultados negativos.

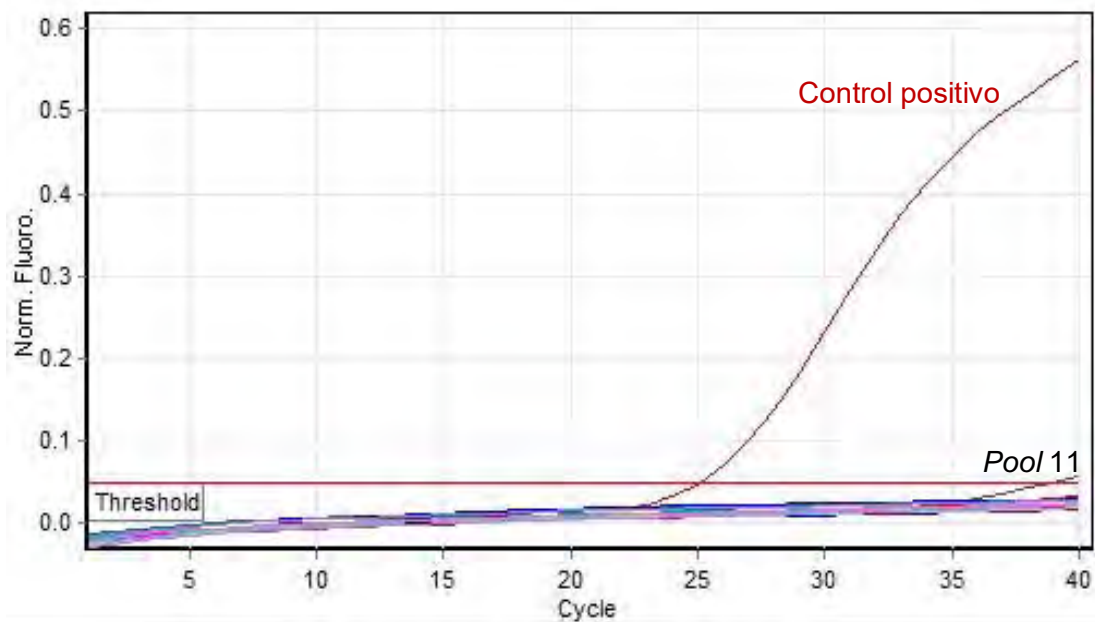


Figura 10. Gráfica de RT-PCR en tiempo real de muestras nasales con hisopo. En el eje de las “x” y de las “y” se observan los ciclos de amplificación y la fluorescencia presentada por cada muestra, respectivamente.

DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

En el Cuadro 5 se observan los resultados obtenidos con la técnica de Inhibición de la Hemaglutinación dirigida a los subtipos virales aislados de patos silvestres en el área de estudio. Ninguno de los sueros porcinos presentó anticuerpos contra el subtipo H5N2. Sin embargo, el 56.52% de los porcinos fueron seropositivos contra el subtipo H1N1, el 26.95% contra el subtipo H3N2 y el 26.08% contra ambos subtipos.

Cuadro 5. Resultados del diagnóstico serológico de VIA en las granjas de cerdos de traspatio de Lerma, Estado de México.

Granja		H1N1		H3N2		Ambos subtipos	
Id	N° de muestras	N° de cerdos seropositivos	%	N° de cerdos seropositivos	%	N° de cerdos seropositivos	%
N° 1	4	4	100	1	25	1	25
N° 2	37	26	70.2	18	48.6	18	48.6
N° 3	12	9	75	0	0	0	0
N° 4	16	13	81.3	12	75	11	68.8
N° 5	20	10	50	0	0	0	0
N° 6	11	1	9.1	0	0	0	0
N° 7	15	2	13.3	0	0	0	0
Total	115	65	56.52	31	26.95	30	26.08

En todas las granjas hubo exposición al subtipo H1N1. Ninguna granja evidenció seropositividad contra el subtipo H5N2. En la granja N°1, sólo fue posible la obtención y procesamiento de 4 muestras, de las cuales todas presentaron presencia de anticuerpos contra el subtipo H1N1 y una de ellas contra el subtipo H3N2. En la granja N°2 el 70.27% de los porcinos mostraron exposición previa al subtipo H1N1 y el 48.65% al subtipo H3N2 en co-seropositividad con el subtipo H1N1. Por otra parte, en la granja N°3, el 75% de los porcinos fueron seropositivos a H1N1, pero ningún animal estuvo expuesto al H3N2. En la granja N°4 el 81.25% fue seropositivo al subtipo H1N1 y el 75% al H3N2; así mismo más de la mitad de los porcinos (68.75%) presentan anticuerpos contra ambos subtipos. Las últimas tres granjas evidenciaron resultados similares. Las granjas N° 5, 6 y 7 no presentaron exposición al subtipo H3N2. Sin embargo, un 50%, 9.09% y 13.33% de los porcinos estuvieron expuestos al H1N1, en cada granja respectivamente (Figura 11).

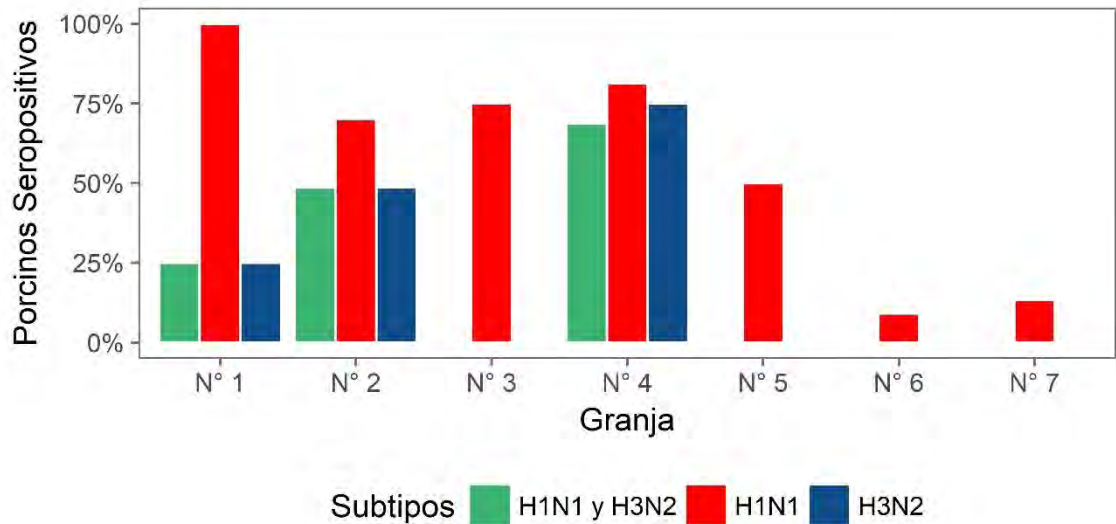


Figura 11. Porcentaje de cerdos seropositivos a virus de influenza A por subtipo y por granja de traspatio.

Se evidenció la exposición al subtipo H1N1 en los porcinos a lo largo de la temporada de muestreo 2016 - 2017, así como ausencia de exposición al subtipo H3N2 en las muestras obtenidas del 19 de febrero al 06 de mayo y el 27 de mayo. Sin embargo, 75% de los cerdos muestreados el 13 de mayo en la granja más lejana a la Ciénega de Atarasquillo (5.6 km) estuvieron expuestos al subtipo H3N2 (Figura 12).

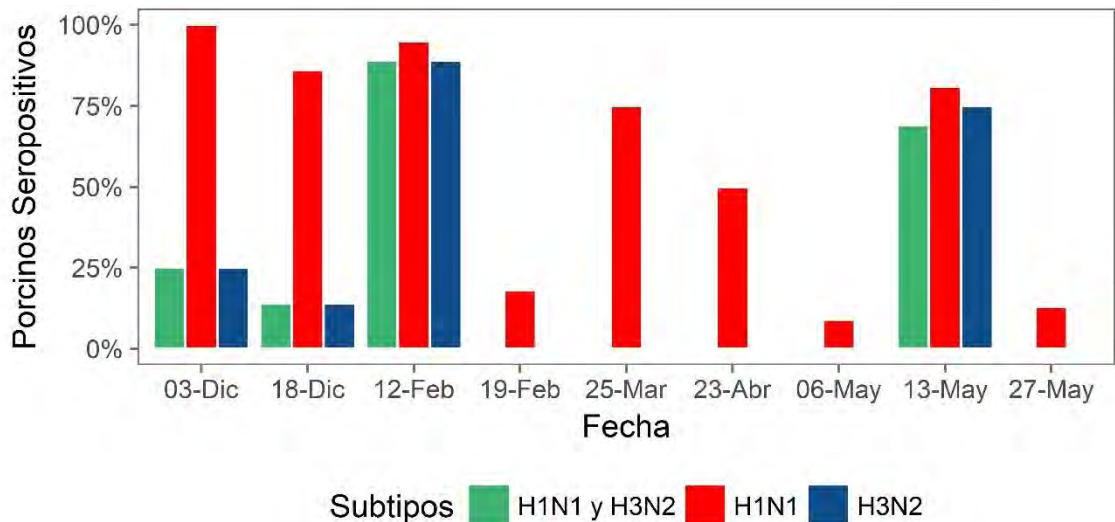


Figura 12. Porcentaje de cerdos de traspatio seropositivos a virus de influenza A por subtipo y fecha de muestreo.

Por otra parte, las granjas que obtuvieron un mayor promedio de títulos de anticuerpos contra el subtipo H1N1 fueron la N° 1 y 3 con 2.0536 (log10), mientras que contra el subtipo H3N2 fue la granja N°4 con 1.9031 (log 10) (Cuadro 6). Asimismo, el mayor título de anticuerpos (2.8062) lo presentó un individuo de la granja N° 4 contra el subtipo H3N2.

Cuadro 6. Promedio de títulos de anticuerpos hacia los subtipos H1N1 y H3N2 por granja.

Subtipo	Granja						
	N°1	N°2	N°3	N°4	N°5	N°6	N°7
H1N1	2.0536	2.0088	2.0536	2.0034	1.7024	1.5747	1.4515
H3N2	1.2258	1.5451	1.0000	1.9031	1.0301	1.0547	1.0000

* Se consideró un título positivo a partir de 1:80. Los resultados fueron transformados a log10.

Sólo tres granjas presentaron co-seropositividad. Los mayores títulos para las muestras doble positivas en las granjas N°1 y 2 fueron evidenciados para el subtipo H1N1, mientras que para la granja N°4 fue el subtipo H3N2, considerando un punto de corte 1.9030 (1:80) (Figura 13).

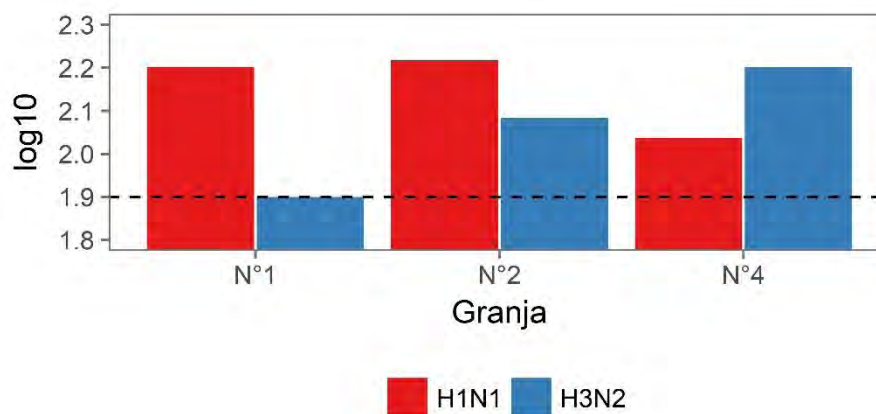


Figura 13. Resultado de sueros dobles positivos al subtipo H1N1 y H3N2 por granja expresados en log10.

No se observa correlación entre la distancia de las granjas a la ciénega y el valor de seropositividad de cada granja para el subtipo H1N1 (Rho= 0.03, p = 0.96), H3N2 (Rho= 0.19, p = 0.67) ni para ambos subtipos (Rho= 0.19, p = 0.67).

DISCUSIÓN

Este estudio describe la caracterización regional de la interfaz, así como el diagnóstico molecular y serológico del virus de influenza en granjas porcinas de traspatio dentro de un radio menor a 6 km de la Ciénega de Atarasquillo (Lerma, Estado de México).

Caracterizar la interfaz entre poblaciones domésticas y silvestres, especialmente mediante parámetros claves como la distribución espacial y temporal de las tasas de contacto es esencial para modelar la dinámica de transmisión de VIA (Cappelle *et al.*, 2011). La falta de herramientas como la telemetría satelital representó una limitante para caracterizar la tasa directa de contacto entre los cerdos y los patos silvestres del presente estudio. Sin embargo, se realizó una aproximación mediante sistemas de información geográfica para efectuar análisis espaciales de la región de interfaz.

Los sistemas productivos de traspatio favorecen las interacciones entre diversas especies animales y han sido asociados con la emergencia de enfermedades infecciosas zoonóticas (Conraths *et al.*, 2011). Granjas localizadas dentro o próximas a sistemas con humedales se consideran zonas de alto riesgo para la transmisión de VIA (Bravo-Vasquez *et al.*, 2016). Igualmente, estas zonas de contacto permiten la congregación de gran cantidad de aves acuáticas propiciando una mayor diversificación viral durante la migración invernal (Cappelle *et al.*, 2011). La cercanía de cuerpos de agua a granjas en las cuales coexisten diversas especies favorece la evolución de VIA y aumenta la probabilidad de emergencia de nuevas variantes antigénicas (Harris *et al.*, 2017). Esto se ha evidenciado con los subtipos H7N9 y H10N8 detectados en aves de corral, los cuales contienen genes de HA y NA derivados de aves silvestres en China (Su *et al.*, 2015). Incluso, estanques artificiales usados para actividades humanas (agricultura, pesca o producciones de traspatio) con presencia de aves migratorias en invierno constituyen un espacio apto para la persistencia de VIA; un ejemplo de ello es el subtipo H6N2 aislado en patos centinelas de la zona Central de México (Barrón-Rodríguez *et al.*, 2018).

En el caso de Lerma, además de las 346 ha de extensión de la Ciénega de Atarasquillo, este municipio es susceptible a inundaciones por sus características físicas, intensas precipitaciones y deficiencias en el sistema de drenaje (Barragán y Figueroa, 2014). En el estudio, todas las granjas se encontraron en cercanía a corrientes superficiales de agua y

dos de las granjas (N° 2 y 7) se ubicaron sobre suelo tipo Phaeozem, el cual se desarrolló sobre planicies lacustres y fluvioviales, siendo una zona susceptible a inundación. Estas áreas inundadas se han asociado con la presentación de infecciones respiratorias agudas en humanos cuya mayor incidencia ocurre en enero, febrero y noviembre (Barragán y Figueroa, 2014). Asimismo, el agua contaminada con heces de aves se reconoce como una ruta de infección en el caso de influenza (Cappelle *et al.*, 2011; Torremorell *et al.*, 2012). La presencia de ríos, arroyos o canales, así como la proporción de área cubierta por inundación se han identificado como factores de riesgo en la presentación de brotes de influenza mediante el uso de modelos espaciales (Van Boeckel *et al.*, 2012). Esta vía indirecta de transmisión es reportada por Karasin *et al.* (2000), debido al aislamiento de un subtipo H4N6 en cerdos de una granja canadiense cuya fuente de agua provenía en ocasiones de un lago cercano. Asimismo, investigadores de Estados Unidos de América mencionan esta posible ruta de transmisión ante el aislamiento y la caracterización genética de un virus H2N3 en dos granjas diseñadas para prevenir la entrada de aves, pero que usaban agua superficial de estanques para la limpieza de instalaciones y como agua de bebida de los porcinos (Ma *et al.*, 2007).

En ninguna granja se reportó contacto directo entre los patos silvestres y los cerdos domésticos muestreados. Sin embargo, los productores mencionaron avistamientos de aves silvestres cerca de las granjas. Aves y otros pequeños mamíferos pueden fungir como hospederos puente para la transmisión de VIA de los cuerpos de agua a las granjas, dado que los patos migratorios raramente habitan los sistemas productivos (Houston *et al.*, 2017; Velkers *et al.*, 2017). No obstante, estudios realizados en áreas con presencia de humedales y granjas han registrado aves migratorias positivas a VIA, pero roedores y aves de áreas peri-domésticas negativos a la infección viral (Grear *et al.*, 2017; Houston *et al.*, 2017).

De igual manera, en el estudio se evidenciaron bajos esquemas de bioseguridad en todas las granjas y contacto cercano entre aves de corral, cerdos y humanos en seis de las siete granjas de traspatio. Además, el 85.7% de estas producciones se localizaron a menos de 2 km de otra granja. Minh *et al.* (2011), así como Pearson *et al.* (2016), han reportado mayores interacciones espaciotemporales relacionadas con riesgo de transmisión de enfermedades entre granjas a menos de 7 km de distancia. Asimismo, Corzo *et al.* (2013)

han detectado ARN viral de los subtipos H1N1, H1N2 y H3N2 hasta a 2.1 km de distancia de una granja porcina infectada. Por lo cual, mencionan a la ruta aerógena como una vía importante de transmisión viral.

Por otra parte, un resultado relevante fue la ausencia de resultados positivos por qRT-PCR en todas las muestras nasales de los cerdos de traspatio; a pesar de la positividad molecular a VIA de patos silvestres que coincidieron espaciotemporalmente con los cerdos de traspatio durante la temporada invernal 2016-2017 (Datos no publicados de un estudio realizado en paralelo). Los resultados moleculares obtenidos concuerdan con una investigación realizada por Jimenez-Bluhm *et al.* (2018), quienes mencionan resultados positivos a VIA en aves silvestres, pero negativos en sistemas productivos de traspatio donde es habitual el grado de contacto entre diversas especies hospederas.

La detección molecular de VIA depende de la colección del tipo apropiado de muestra, la calidad de la muestra, así como su adecuado manejo y almacenamiento. Secreciones nasales o fluidos orales son recomendados para el diagnóstico de VIA ante-mortem, así como su colecta en tubos con Medio Mínimo Esencial (MEM) u otros medios de transporte viral (Culhane y Detmer, 2014). En el presente estudio la toma de muestras se realizó según lo reportado en la literatura. Asimismo, se utilizó el kit comercial “*VetMAX™-Gold SIV Detection Kit*”, el cual cuenta con licencia del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), y es altamente sensible - específico para la detección de VIA en muestras nasales con hisopo (Zhang y Harmon, 2014). Sin embargo, se ha reportado que la realización de *pools* de muestras puede reducir la oportunidad de detectar el VIA debido a la reducción del título viral de la muestra positiva (Ssematimba *et al.*, 2018). Además, estudios previos han reportado una mayor detección viral de VIA de origen aviar (ej. subtipos H5 y H7) en el tracto respiratorio inferior por medio de muestras de lavado bronco-alveolar e hisopos traqueales en cerdos comparado con muestras nasales con hisopo (Balzli *et al.*, 2016; Meseke *et al.*, 2018).

Existen diversos factores involucrados en la transmisión de VIA como: la excreción viral, la estabilidad en el ambiente y el grado de contacto o mezcla con otras especies hospederas (Awosanya *et al.*, 2013; Joseph *et al.*, 2017). Asimismo, existen factores intrínsecos virológicos o intra-hospedero implicados en la transmisión de VIA entre especies (Bourret,

2018). Dentro de los cuales, características adaptativas como cambios en la preferencia de receptor dado por mutaciones en aminoácidos de la HA y mutaciones en el complejo de las ribo-nucleoproteínas (PB1, PB2, PA y NP) implicadas en la replicación viral, son claves en el proceso de emergencia del virus de influenza. Igualmente, aspectos como el estado de salud, el estatus inmunitario y la edad de los hospederos desempeñan un papel importante en la transmisión interespecie (Munoz *et al.*, 2016).

En los cerdos, la excreción viral a través de secreciones nasales y la replicación del virus en los pulmones es de corta duración. Esta se limita a aproximadamente 5 - 8 días después de la infección (Corzo *et al.*, 2013; De Vleeschauwer *et al.*, 2009a). Además de ello, las infecciones con subtipos de origen aviar como H1N1, H4N1, H5N1 y H7N1 resultan en la diseminación de pocas cantidades de virus por 3 a 6 días sin una eficiente transmisión cerdo a cerdo (De Vleeschauwer *et al.*, 2009b). Por lo cual, se menciona a la falta de prevalencia molecular como un posible hallazgo debido a la ausencia de exposición reciente de cerdos al VIA durante el tiempo de colecta de las muestras (Awosanya *et al.*, 2013).

Igualmente, algunos estudios han reportado bajas o nulas prevalencias a VIA en cerdos de traspatio durante la temporada invernal, lo cual coincide con los resultados obtenidos en el presente estudio (Jimenez-Bluhm *et al.*, 2018; Olson *et al.*, 2014). Sin embargo, en condiciones in-vitro se reporta una persistencia viral prolongada en ambientes acuáticos a bajas temperaturas (<17°C), pH ligeramente básico (7.4 - 8.2) y baja salinidad (< 20,000 ppm), pudiendo ser infeccioso más de 30 días a una temperatura por debajo de los 0°C (Brown *et al.*, 2009; Joseph *et al.*, 2017). De igual manera, aunque se reporta un pobre aislamiento viral en condiciones in situ, un estudio previo en las Ciénegas de Lerma reportó el aislamiento de un VIA subtipo H4N2 en muestras de agua entre 6 a 16°C y pH entre 7.0 a 7.8 (Obregón-Ascencio, 2011; Ornelas-Eusebio *et al.*, 2015). La temperatura promedio del área de estudio durante la colecta de las muestras fue de 13°C (máx. 21°C, mín. 4°C). No obstante, la propagación viral también depende de la humedad (Brown *et al.*, 2009). En el área de estudio, la humedad relativa promedio fue de 57% (máx. 87%, mín. 26%). Humedades relativas $\geq 40\%$ han mostrado pérdida de infectividad viral. Por lo cual, condiciones secas (baja humedad relativa de 20-35%) favorecen la transmisión de VIA, mientras que ambientes con alta humedad relativa (80%) la bloquean completamente (Lowen *et al.*, 2007).

De igual manera, otro de los hallazgos más relevantes fue la presencia de anticuerpos contra los subtipos H1N1 y H3N2 aislados de patos silvestres de la Ciénega de Atarasquillo durante la temporada invernal 2016 – 2017. Los resultados serológicos fueron obtenidos por medio de la técnica de IH. Esta prueba es fácil de realizar, económica y rápida, por lo que es la más comúnmente utilizada para la detección de anticuerpos específicos anti-influenza en muestras de suero. Sin embargo, el suero de diversas especies de mamíferos contiene hemaglutininas e inhibidores inespecíficos que pueden interferir con su especificidad (Pedersen, 2014). Por ende, los sueros porcinos evaluados recibieron un tratamiento previo.

En el presente estudio, el 56.52% de los porcinos fueron seropositivos contra el subtipo H1N1, el 26.95% contra el subtipo H3N2 y el 26.08% contra ambos subtipos. Estos resultados son similares a los reportados previamente en el noreste de México con alta seropositividad a los subtipos H1N1 (55%), H3N2 (59%) y hacia ambos subtipos (38%) (López-Robles *et al.*, 2014). Asimismo, la falta de seropositividad contra el subtipo H5N2 evidenciada en el presente estudio es consistente con un estudio realizado en Egipto, cuya área de estudio estaba cerca al sitio principal de paro de aves migratorias, se encontraba próxima a un foco de infección de VIA y los cerdos eran alimentados con restos orgánicos incluyendo aves muertas. No obstante, se detectó una muy baja seroprevalencia del subtipo H5 en 240 cerdos de 11 granjas (El-Sayed *et al.*, 2010).

Resultados similares fueron reportados por Jung *et al.* (2007), quienes describen seropositividades del 51.2% para el subtipo H1, 43.7% para el subtipo H3 y 25.3% para ambos subtipos, pero seronegatividad al subtipo H5 de origen aviar en 742 muestras por medio de las técnicas de IH y SVN en Corea. Por lo tanto, los estudios de seroprevalencia de VIA de origen aviar en porcinos han sugerido una transmisión esporádica en lugar de una circulación persistente entre cerdos debido a la baja adaptación de la mayoría de las cepas aviares a la replicación y transmisión en nuevos hospederos (Baudon *et al.*, 2017; Bourret, 2018; Yassine *et al.*, 2011). Asimismo, a nivel experimental se ha reportado la producción de bajos títulos virales, poca carga viral en pulmones y excreción nasal de VIA reducida tras la inoculación del subtipo H5N2 en porcinos (De Vleeschauwer *et al.*, 2009a). Incluso, se ha observado protección parcial contra el virus de influenza aviar H5N1 de baja

patogenicidad en cerdos debido a infecciones previas con virus de influenza H1N1 de origen porcino (Van Reeth *et al.*, 2009).

No obstante, la interpretación de la prueba diagnóstica depende del estatus de vacunación y exposición de los animales (Kitikoon *et al.*, 2014). La producción de anticuerpos por vacunación es de corta duración. En el caso de los porcinos, Desrosiers *et al.* (2004) reportan la ocurrencia de un pico en el título de anticuerpos dos semanas después de la vacunación y una posterior seronegatividad detectada por IH o ELISA ocho semanas después. Por lo cual, altos títulos de anticuerpos en animales no vacunados se asocian frecuentemente con infecciones recientes. En el caso de Lerma, los cerdos de traspatio muestreados no habían sido vacunados contra VIA según los productores. Sin embargo, se presentaron títulos de anticuerpos contra los subtipos H1N1 (principalmente la granja N° 1 y 3) y H3N2 (principalmente la granja N° 4). Asimismo, en el presente estudio el subtipo H1N1 fue el que mostró con mayor frecuencia mayores títulos de anticuerpos (2.5051), lo cual concuerda con un estudio previo en producciones de traspatio en la Ciudad de México (Saavedra-Montañez *et al.*, 2013).

Finalmente, en este estudio no se evidenció una correlación entre la distancia granja-ciénega y los valores de seropositividad por granja para los subtipos H1N1, H3N2 ni para ambos subtipos. La granja N°4 ubicada a 5.6 km de la ciénega evidenció una seropositividad del 81.3% para el subtipo H1N1 y 75% para el subtipo H3N2, mientras que la granja N° 7 presentó una baja seropositividad para el subtipo H1N1 (13.3%) y una nula seropositividad para el subtipo H3N2, a pesar de su cercanía considerable al centroide de la ciénega (1.5 km). Estos resultados son contrarios a lo propuesto por Harris *et al.* (2017), quienes mencionan la proximidad de granjas a recursos externos de agua como un factor epidemiológico importante en la propagación de VIA. No obstante, el cálculo del coeficiente de correlación de Spearman del presente estudio se realizó con los valores obtenidos en siete granjas muestreadas en cinco meses diferentes. Por lo cual, se destaca la necesidad de ampliar el muestreo espaciotemporalmente para futuros análisis, ya que la dinámica de transmisión del VIA es compleja e involucra la participación de múltiples factores ecológicos, socioeconómicos y virológicos, así como de múltiples interacciones entre el virus, los hospederos y el ambiente (Yoo *et al.*, 2018).

CONCLUSIONES

Con base en los resultados del presente estudio se evidenció: 1) falta de información actualizada relacionada con la población porcina de traspatio y su participación en la transmisión de enfermedades infecciosas en el municipio de Lerma, 2) presencia de factores epidemiológicos claves en la propagación viral como: proximidad de granjas a cuerpos de agua y patos silvestres, contacto directo/indirecto con aves de corral, bajos esquemas de bioseguridad y cercanía a otras granjas, 3) ausencia de infección por VIA mediante qRT-PCR en muestras nasales de cerdos de traspatio localizados a menos de 6 km de la Ciénega de Atarasquillo durante la temporada invernal 2016 – 2017, lo cual puede ser debido al tamaño de muestra, al corto período de excreción viral, a la falta de persistencia viral en el ambiente, a la dilución de la muestra positiva por realización de *pools*, entre otros factores y 4) presencia de anticuerpos detectados mediante la técnica de IH contra los subtipos H1N1 y H3N2 provenientes de patos silvestres que coinciden espacio temporalmente con las granjas muestreadas. Sin embargo, los resultados no aportan evidencia que soporte que la convergencia temporal y espacial que ocurre en la interfaz entre unidades de producción porcina de traspatio y la migración de aves acuáticas favorezca la diversificación de VIA en cerdos.

RECOMENDACIONES

- Generar información actualizada sobre las producciones porcinas de traspatio en Lerma mediante la implementación de encuestas.
- Ampliar la escala temporal y espacial del estudio.
- Continuar con el estudio del papel que desempeñan el agua de las Ciénegas de Lerma y cuerpos de agua asociados a producciones de traspatio dentro del mantenimiento de VIA.
- Profundizar en el entendimiento de la dinámica de transmisión de virus de influenza A en esta interfaz mediante una aproximación integral que combine datos serológicos y moleculares junto con información medioambiental y socioeconómica.

ABREVIATURAS

AICA	Área de importancia para la conservación de aves
ANP	Área Natural Protegida
ARN	Ácido ribonucleico
CONACYT	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
CONABIO	Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad
DEFSAL	Departamento de Etología, Fauna Silvestre y Animales de Laboratorio
DMZC	Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EMEM	Medio Mínimo Esencial de Eagle
FMVZ	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
HA	Hemaglutinina
HPAI	Virus de influenza aviar de alta patogenicidad
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IH	Inhibición de la Hemaglutinación
IHC	Inmunohistoquímica
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
Kb	Kilobase
LPAI	Virus de influenza aviar de baja patogenicidad
µL	Microlitros
M	Matriz
M1	Proteína de matriz 1
M2	Proteína de matriz 2

MDCK	Línea celular de riñón de perro Madin-Derby
NA	Neuraminidasa
NEP	Proteína exportadora nuclear
NP	Nucleoproteína
NS	No estructural
NS1	Proteína no estructural 1
NS2	Proteína no estructural 2
NTC	Control sin templado
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PA	Polimerasa Ácida
PB1	Polimerasa Básica 1
PB2	Polimerasa Básica 2
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos
RPM	Revoluciones por minuto
SVN	Seroneutralización viral
SICUAE	Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación
UHA	Unidades Hemaglutinantes
VIA	Virus de influenza A
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
qRT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa en tiempo real

REFERENCIAS

- Abente, E.J., Gauger, P.C., Walia, R.R., Rajao, D.S., Zhang, J., Harmon, K.M., Killian, M.L., Vincent, A.L., 2017. Detection and characterization of an H4N6 avian-lineage influenza A virus in pigs in the Midwestern United States. *Virology* 511, 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.08.021>
- Álvarez, M., Rodríguez, J.C., Ciprián, A., Rodríguez, L., Ayora, G., Segura, J.C., 2004. Perfil serológico del virus de influenza porcina, *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Actinobacillus pleuropneumoniae* en granjas de Yucatán, México. *Vet. México OA* 35, 295–305.
- Awosanya, E.J., Babalobi, O., Omilabu, S., Nguku, P., Ogundipe, G., 2013. Prevalence and correlates of influenza-a in piggery workers and pigs in two communities in Lagos, Nigeria. *Pan Afr. Med. J.* 16. <https://doi.org/10.11604/pamj.2013.16.102.1450>
- Balzli, C., Lager, K., Vincent, A., Gauger, P., Brockmeier, S., Miller, L., Richt, J.A., Ma, W., Suarez, D., Swayne, D.E., 2016. Susceptibility of swine to H5 and H7 low pathogenic avian influenza viruses. *Influenza Other Respir. Viruses* 10, 346–352. <https://doi.org/10.1111/irv.12386>
- Barasona, J.A., Latham, M.C., Acevedo, P., Armenteros, J.A., Latham, A.D.M., Gortazar, C., Carro, F., Soriguer, R.C., Vicente, J., 2014. Spatiotemporal interactions between wild boar and cattle: implications for cross-species disease transmission. *Vet. Res.* 45. <https://doi.org/10.1186/s13567-014-0122-7>
- Barbazan, P., Thitithanyanont, A., Missé, D., Dubot, A., Bosc, P., Luangsri, N., Gonzalez, J.-P., Kittayapong, P., 2008. Detection of H5N1 Avian Influenza Virus from Mosquitoes Collected in an Infected Poultry Farm in Thailand. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 8, 105–110. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0142>
- Barragán, M. del P., Figueroa, E., 2014. Riesgos a la salud humana relacionados con la expansión urbana en zonas susceptibles a inundación: Caso de estudio Guadalupe la Ciénega, Lerma. Universidad Autónoma del Estado de México.
- Barrón-Rodríguez RJ, Chávez-Maya F, Loza-Rubio E, García-Espinosa G, 2018. Isolation and characterization of influenza A virus (H6N2) from a temporary artificial pond in Mexico. *Vet. México OA* 5. <https://doi.org/10.21753/vmoa.5.2.475>

- Baudon, E., Peyre, M., Peiris, M., Cowling, B.J., 2017. Epidemiological features of influenza circulation in swine populations: A systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE* 12, e0179044. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179044>
- Bengtsson, D., Safi, K., Avril, A., Fiedler, W., Wikelski, M., Gunnarsson, G., Elmberg, J., Tolf, C., Olsen, B., Waldenström, J., 2016. Does influenza A virus infection affect movement behaviour during stopover in its wild reservoir host? *R. Soc. Open Sci.* 3, 150633. <https://doi.org/10.1098/rsos.150633>
- Bourret, V., 2018. Avian influenza viruses in pigs: An overview. *Vet. J.* 239, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.07.005>
- Bravo-Vasquez, N., Di Pillo, F., Lazo, A., Jiménez-Bluhm, P., Schultz-Cherry, S., Hamilton-West, C., 2016. Presence of influenza viruses in backyard poultry and swine in El Yali wetland, Chile. *Prev. Vet. Med.* 134, 211–215. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.10.004>
- Brown, J.D., Goekjian, G., Poulson, R., Valeika, S., Stallknecht, D.E., 2009. Avian influenza virus in water: Infectivity is dependent on pH, salinity and temperature. *Vet. Microbiol.* 136, 20–26. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.10.027>
- Cao, N., Zhu, W., Chen, Y., Tan, L., Zhou, P., Cao, Z., Ke, C., Li, Y., Wu, J., Qi, W., Jiao, P., Zhang, G., 2013. Avian influenza A (H5N1) virus antibodies in pigs and residents of swine farms, southern China. *J. Clin. Virol.* 58, 647–651. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2013.09.017>
- Cappelle, J., Gaidet, N., Iverson, S.A., Takekawa, J.Y., Newman, S.H., Fofana, B., Gilbert, M., 2011. Characterizing the interface between wild ducks and poultry to evaluate the potential of transmission of avian pathogens. *Int. J. Health Geogr.* 10, 60. <https://doi.org/10.1186/1476-072X-10-60>
- Casa, G., 2002. Hidrología lótica del Estado de México.
- Chen, J., Ma, J., White, S.K., Cao, Z., Zhen, Y., He, S., Zhu, W., Ke, C., Zhang, Y., Su, S., Zhang, G., 2015. Live poultry market workers are susceptible to both avian and swine influenza viruses, Guangdong Province, China. *Vet. Microbiol.* 181, 230–235. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.09.016>
- Choi, M.J., Torremorell, M., Bender, J.B., Smith, K., Boxrud, D., Ertl, J.R., Yang, M., Suwannakarn, K., Her, D., Nguyen, J., Uyeki, T.M., Levine, M., Lindstrom, S., Katz, J.M., Jhung, M., Vetter, S., Wong, K.K., Sreevatsan, S., Lynfield, R., 2015. Live Animal Markets in Minnesota: A Potential Source for Emergence of Novel Influenza

- A Viruses and Interspecies Transmission. *Clin. Infect. Dis.* 61, 1355–1362. <https://doi.org/10.1093/cid/civ618>
- Choi, Y.K., Nguyen, T.D., Ozaki, H., Webby, R.J., Puthavathana, P., Buranathal, C., Chaisingh, A., Auewarakul, P., Hanh, N.T.H., Ma, S.K., Hui, P.Y., Guan, Y., Peiris, J.S.M., Webster, R.G., 2005. Studies of H5N1 Influenza Virus Infection of Pigs by Using Viruses Isolated in Vietnam and Thailand in 2004. *J. Virol.* 79, 10821–10825. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.16.10821-10825.2005>
- Conraths, F.J., Schwabenbauer, K., Vallat, B., Meslin, F.-X., Füßel, A.-E., Slingenbergh, J., Mettenleiter, T.C., 2011. Animal health in the 21st century—A global challenge. *Prev. Vet. Med.* 102, 93–97. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.04.003>
- Corzo, C.A., Culhane, M., Dee, S., Morrison, R.B., Torremorell, M., 2013. Airborne Detection and Quantification of Swine Influenza A Virus in Air Samples Collected Inside, Outside and Downwind from Swine Barns. *PLoS ONE* 8, e71444. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071444>
- Crisci, E., Mussá, T., Fraile, L., Montoya, M., 2013. Review: Influenza virus in pigs. *Mol. Immunol.* 55, 200–211. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2013.02.008>
- Cuevas-Domínguez, González-Guzmán, 2009. Detección de orthomyxovirus H7N3 en anátidos del Estado de México. *Rev. Electrónica Vet.* 10.
- Culhane, M.R., Detmer, S.E., 2014. Sample Types, Collection, and Transport for Influenza A Viruses of Swine, in: Spackman, E. (Ed.), *Animal Influenza Virus*. Springer New York, New York, NY, pp. 259–263. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0758-8_21
- Dalziel, A.E., Delean, S., Heinrich, S., Cassey, P., 2016. Persistence of Low Pathogenic Influenza A Virus in Water: A Systematic Review and Quantitative Meta-Analysis. *PLOS ONE* 11, e0161929. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161929>
- De Vleeschauwer, A., Atanasova, K., Van Borm, S., van den Berg, T., Rasmussen, T.B., Uttenthal, Å., Van Reeth, K., 2009a. Comparative Pathogenesis of an Avian H5N2 and a Swine H1N1 Influenza Virus in Pigs. *PLoS ONE* 4, e6662. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006662>
- De Vleeschauwer, A., Van Poucke, S., Braeckmans, D., Van Doorselaere, J., Van Reeth, K., 2009b. Efficient Transmission of Swine-Adapted but Not Wholly Avian Influenza Viruses among Pigs and from Pigs to Ferrets. *J. Infect. Dis.* 200, 1884–1892. <https://doi.org/10.1086/648475>

- Desvaux, S., Grosbois, V., Pham, T.T.H., Fenwick, S., Tollis, S., Pham, N.H., Tran, A., Roger, F., 2011. Risk Factors of Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 Occurrence at the Village and Farm Levels in the Red River Delta Region in Vietnam: Case-control study on HPAI H5N1 in Northern Vietnam. *Transbound. Emerg. Dis.* 58, 492–502. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01227.x>
- Detmer, S., Gramer, M., Goyal, S., Torremorell, M., Torrison, J., 2012. Diagnostics and Surveillance for Swine Influenza, in: Richt, J.A., Webby, R.J. (Eds.), *Swine Influenza*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 85–112. https://doi.org/10.1007/82_2012_220
- Diego Ochoa Vallejo, 2010. Prevalencia de factores de riesgo para infección por virus de influenza aviar en personas dedicadas a actividades cinegéticas en Lerma, Estado de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.
- Donatelli, I., Castrucci, M.R., De Marco, M.A., Delogu, M., Webster, R.G., 2016. Human–Animal Interface: The Case for Influenza Interspecies Transmission, in: Rezza, G., Ippolito, G. (Eds.), *Emerging and Re-Emerging Viral Infections*. Springer International Publishing, Cham, pp. 17–33. https://doi.org/10.1007/5584_2016_136
- El-Sayed, A., Awad, W., Fayed, A., Hamann, H.-P., Zschöck, M., 2010. Avian Influenza Prevalence in Pigs, Egypt. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 726–727. <https://doi.org/10.3201/eid1604.091316>
- ESRI, 2011. ArcGIS Desktop: Release 10. Environmental Systems Research Institute, Redlands, CA.
- Gauger, P.C., Loving, C.L., Vincent, A.L., 2014. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Serum or Mucosal Isotype-Specific IgG and IgA Whole-Virus Antibody to Influenza A Virus in Swine, in: Spackman, E. (Ed.), *Animal Influenza Virus*. Springer New York, New York, NY, pp. 303–312. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0758-8_25
- Gauger, P.C., Vincent, A.L., 2014. Serum Virus Neutralization Assay for Detection and Quantitation of Serum-Neutralizing Antibodies to Influenza A Virus in Swine, in: Spackman, E. (Ed.), *Animal Influenza Virus*. Springer New York, New York, NY, pp. 313–324. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0758-8_26
- Gomaa, M.R., Kandeil, A., El-Shesheny, R., Shehata, M.M., McKenzie, P.P., Webby, R.J., Ali, M.A., Kayali, G., 2018. Evidence of infection with avian, human, and swine

- influenza viruses in pigs in Cairo, Egypt. *Arch. Virol.* 163, 359–364. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3619-3>
- Grear, D.A., Dusek, R.J., Walsh, D.P., Hall, J.S., 2017. NO EVIDENCE OF INFECTION OR EXPOSURE TO HIGHLY PATHOGENIC AVIAN INFLUENZAS IN PERIDOMESTIC WILDLIFE ON AN AFFECTED POULTRY FACILITY. *J. Wildl. Dis.* 53, 37–45. <https://doi.org/10.7589/2016-02-029>
- Gutiérrez-Ruiz EJ, Aranda-Cirerol FJ, Rodríguez-Vivas RI, Bolio-González ME, Ramírez González S, Estrella-Tec J, 2012. Factores sociales de la crianza de animales de traspatio en Yucatán, México. *Bioagrociencias* 5, 20–28.
- Harris, K.A., Freidl, G.S., Munoz, O.S., von Dobschuetz, S., De Nardi, M., Wieland, B., Koopmans, M.P.G., Stärk, K.D.C., van Reeth, K., Dauphin, G., Meijer, A., de Bruin, E., Capua, I., Hill, A.A., Kosmider, R., Banks, J., Stevens, K., van der Werf, S., Enouf, V., van der Meulen, K., Brown, I.H., Alexander, D.J., Breed, A.C., 2017. Epidemiological Risk Factors for Animal Influenza A Viruses Overcoming Species Barriers. *EcoHealth*. <https://doi.org/10.1007/s10393-017-1244-y>
- Houston, D.D., Azeem, S., Lundy, C.W., Sato, Y., Guo, B., Blanchong, J.A., Gauger, P.C., Marks, D.R., Yoon, K.-J., Adelman, J.S., 2017. Evaluating the role of wild songbirds or rodents in spreading avian influenza virus across an agricultural landscape. *PeerJ* 5, e4060. <https://doi.org/10.7717/peerj.4060>
- Hu, Y., Liu, X., Li, S., Guo, X., Yang, Y., Jin, M., 2012. Complete Genome Sequence of a Novel H4N1 Influenza Virus Isolated from a Pig in Central China. *J. Virol.* 86, 13879–13879. <https://doi.org/10.1128/JVI.02726-12>
- Hulo, C., de Castro, E., Masson, P., Bougueleret, L., Bairoch, A., Xenarios, I., Le Mercier, P., 2011. ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity. *Nucleic Acids Res.* 39, D576–D582. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq901>
- ICTV, 2017. Virus taxonomy: 2017 release.
- INEGI, 2017. Conjunto de datos vectoriales de información topográfica escala 1:50 000 serie III. III.
- INEGI, 2016. Áreas geoestadísticas municipales, 2015.
- INEGI, 2014. Conjunto de datos vectoriales edafológico, escala 1:250000 Serie II.
- INEGI, 2007. Censo Agrícola, Ganadero y Forestal (Tabulados por entidad y Municipio). México.

- Jiménez Nápoles, J.L., 2006. Determinación de anticuerpos contra el virus de influenza porcino serotipo H3N2 en cerdos de diferentes sistemas de producción en México. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.
- Jimenez-Bluhm, P., Di Pillo, F., Bahl, J., Osorio, J., Schultz-Cherry, S., Hamilton-West, C., 2018. Circulation of influenza in backyard productive systems in central Chile and evidence of spillover from wild birds. *Prev. Vet. Med.* 153, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.02.018>
- Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L., Daszak, P., 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451, 990–993. <https://doi.org/10.1038/nature06536>
- Joseph, U., Su, Y.C.F., Vijaykrishna, D., Smith, G.J.D., 2017. The ecology and adaptive evolution of influenza A interspecies transmission. *Influenza Other Respir. Viruses* 11, 74–84. <https://doi.org/10.1111/irv.12412>
- Jourdain, E., van Riel, D., Munster, V.J., Kuiken, T., Waldenström, J., Olsen, B., Ellström, P., 2011. The Pattern of Influenza Virus Attachment Varies among Wild Bird Species. *PLoS ONE* 6, e24155. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024155>
- Jung, K., Song, D.-S., Kang, B.-K., Oh, J.-S., Park, B.-K., 2007. Serologic surveillance of swine H1 and H3 and avian H5 and H9 influenza A virus infections in swine population in Korea. *Prev. Vet. Med.* 79, 294–303. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2006.12.005>
- Karasin, A.I., Brown, I.H., Carman, S., Olsen, C.W., 2000. Isolation and Characterization of H4N6 Avian Influenza Viruses from Pigs with Pneumonia in Canada. *J. Virol.* 74, 9322–9327. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.19.9322-9327.2000>
- Kida, H., Ito, T., Yasuda, J., Shimizu, Y., Itakura, C., Shortridge, K.F., Kawaoka, Y., Webster, R.G., 1994. Potential for transmission of avian influenza viruses to pigs. *J. Gen. Virol.* 75, 2183–2188. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-9-2183>
- Kitikoon, P., Gauger, P.C., Vincent, A.L., 2014. Hemagglutinin Inhibition Assay with Swine Sera, in: Spackman, E. (Ed.), *Animal Influenza Virus*. Springer New York, New York, NY, pp. 295–301. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0758-8_24
- Lauterbach, S.E., Wright, C.M., Zentkovich, M.M., Nelson, S.W., Lorbach, J.N., Bliss, N.T., Nolting, J.M., Pierson, R.M., King, M.D., Bowman, A.S., 2018. Detection of influenza A virus from agricultural fair environment: Air and surfaces. *Prev. Vet. Med.* 153, 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.02.019>

- Lebl, K., Lentz, H.H.K., Pinior, B., Selhorst, T., 2016. Impact of Network Activity on the Spread of Infectious Diseases through the German Pig Trade Network. *Front. Vet. Sci.* 3. <https://doi.org/10.3389/fvets.2016.00048>
- Lekcharoensuk, P., Lager, K.M., Vemulapalli, R., Woodruff, M., Vincent, A.L., Richt, J.A., 2006. Novel Swine Influenza Virus Subtype H3N1, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 787–794. <https://doi.org/10.3201/eid1205.051060>
- Lewis, N.S., Russell, C.A., Langat, P., Anderson, T.K., Berger, K., Bielejec, F., Burke, D.F., Dudas, G., Fonville, J.M., Fouchier, R.A., Kellam, P., Koel, B.F., Lemey, P., Nguyen, T., Nuansrichy, B., Peiris, J.M., Saito, T., Simon, G., Skepner, E., Takemae, N., ESNIP3 consortium, Webby, R.J., Van Reeth, K., Brookes, S.M., Larsen, L., Watson, S.J., Brown, I.H., Vincent, A.L., 2016. The global antigenic diversity of swine influenza A viruses. *eLife* 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.12217>
- Lipatov, A.S., Kwon, Y.K., Sarmiento, L.V., Lager, K.M., Spackman, E., Suarez, D.L., Swayne, D.E., 2008. Domestic Pigs Have Low Susceptibility to H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses. *PLoS Pathog.* 4, e1000102. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000102>
- Lombardo, T., Dotti, S., Renzi, S., Ferrari, M., 2012. Susceptibility of different cell lines to Avian and Swine Influenza viruses. *J. Virol. Methods* 185, 82–88. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.06.008>
- López-Robles, G., Montalvo-Corral, M., Burgara-Estrella, A., Hernández, J., 2014. Serological and molecular prevalence of swine influenza virus on farms in northwestern Mexico. *Vet. Microbiol.* 172, 323–328. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.05.017>
- Lowen, A.C., Mubareka, S., Steel, J., Palese, P., 2007. Influenza Virus Transmission Is Dependent on Relative Humidity and Temperature. *PLoS Pathog.* 3, e151. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030151>
- Lugovtsev, V.Y., Melnyk, D., Weir, J.P., 2013. Heterogeneity of the MDCK Cell Line and Its Applicability for Influenza Virus Research. *PLoS ONE* 8, e75014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075014>
- Ma, W., Vincent, A.L., Gramer, M.R., Brockwell, C.B., Lager, K.M., Janke, B.H., Gauger, P.C., Patnayak, D.P., Webby, R.J., Richt, J.A., 2007. Identification of H2N3 influenza A viruses from swine in the United States. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 20949–20954. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710286104>

- Mancera Gracia, J.C., Van den Hoecke, S., Richt, J.A., Ma, W., Saelens, X., Van Reeth, K., 2017. A reassortant H9N2 influenza virus containing 2009 pandemic H1N1 internal-protein genes acquired enhanced pig-to-pig transmission after serial passages in swine. *Sci. Rep.* 7. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01512-x>
- Maya, B., 2017. Dinámica de infección y descripción del cuadro clínico del subtipo de influenza H5N2 aviar, aislado en cerdo. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Meseko, C., Globig, A., Ijomanta, J., Joannis, T., Nwosuh, C., Shamaki, D., Harder, T., Hoffman, D., Pohlmann, A., Beer, M., Mettenleiter, T., Starick, E., 2018. Evidence of exposure of domestic pigs to Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 in Nigeria. *Sci. Rep.* 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24371-6>
- Miller, R.S., Farnsworth, M.L., Malmberg, J.L., 2013. Diseases at the livestock–wildlife interface: Status, challenges, and opportunities in the United States. *Prev. Vet. Med.* 110, 119–132. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.11.021>
- Minh, P.Q., Stevenson, M.A., Jewell, C., French, N., Schauer, B., 2011. Spatio–temporal analyses of highly pathogenic avian influenza H5N1 outbreaks in the Mekong River Delta, Vietnam, 2009. *Spat. Spatio-Temporal Epidemiol.* 2, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.sste.2010.11.001>
- Montalvo-Corral, M., Hernández, J., 2010. Genetic analysis of avian influenza virus from migratory waterfowl in Mexico. *Arch. Virol.* 155, 97–101. <https://doi.org/10.1007/s00705-009-0554-y>
- Munoz, O., De Nardi, M., van der Meulen, K., van Reeth, K., Koopmans, M., Harris, K., von Dobschuetz, S., Freidl, G., Meijer, A., Breed, A., Hill, A., Kosmider, R., Banks, J., Stärk, K.D.C., Wieland, B., Stevens, K., van der Werf, S., Enouf, V., Dauphin, G., Dundon, W., Cattoli, G., Capua, I., 2016. Genetic Adaptation of Influenza A Viruses in Domestic Animals and Their Potential Role in Interspecies Transmission: A Literature Review. *EcoHealth* 13, 171–198. <https://doi.org/10.1007/s10393-014-1004-1>
- Nelli, R.K., Kuchipudi, S.V., White, G.A., Perez, B., Dunham, S.P., Chang, K.-C., 2010. Comparative distribution of human and avian type sialic acid influenza receptors in the pig. *BMC Vet. Res.* 6, 4. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-6-4>
- Nelson, M., Culhane, M.R., Rovira, A., Torremorell, M., Guerrero, P., Norambuena, J., 2015. Novel Human-like Influenza A Viruses Circulate in Swine in Mexico and Chile. *PLoS*

- Curr.
<https://doi.org/10.1371/currents.outbreaks.c8b3207c9bad98474eca3013fa933ca6>
- Nelson, M.I., Viboud, C., Vincent, A.L., Culhane, M.R., Detmer, S.E., Wentworth, D.E., Rambaut, A., Suchard, M.A., Holmes, E.C., Lemey, P., 2015. Global migration of influenza A viruses in swine. *Nat. Commun.* 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms7696>
- Netrabukkana, P., Robertson, I.D., Kasemsuwan, S., Wongsathapornchai, K., Fenwick, S., 2016. Assessing Potential Risks of Influenza A Virus Transmission at the Pig-Human Interface in Thai Small Pig Farms Using a Questionnaire Survey. *Transbound. Emerg. Dis.* 63, e135–e139. <https://doi.org/10.1111/tbed.12226>
- Neumann, G., Kawaoka, Y., 2015. Transmission of influenza A viruses. *Virology* 479–480, 234–246. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.009>
- Nidom, C.A., Takano, R., Yamada, S., Sakai-Tagawa, Y., Daulay, S., Aswadi, D., Suzuki, T., Suzuki, Y., Shinya, K., Iwatsuki-Horimoto, K., Muramoto, Y., Kawaoka, Y., 2010. Influenza A (H5N1) Viruses from Pigs, Indonesia. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 1515–1523. <https://doi.org/10.3201/eid1610.100508>
- Obregón-Ascencio, A., 2011. Condiciones hidrológicas in situ de un bordo con aves acuáticas migratorias durante el aislamiento del virus de influenza tipo A. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.
- OIE, 2017. Situation Report for Avian Influenza.
- Olson, S.H., Parmley, J., Soos, C., Gilbert, M., Latorre-Margalef, N., Hall, J.S., Hansbro, P.M., Leighton, F., Munster, V., Joly, D., 2014. Sampling Strategies and Biodiversity of Influenza A Subtypes in Wild Birds. *PLoS ONE* 9, e90826. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090826>
- OPS, 2010. Diagnóstico de virus influenza en mamíferos y aves. Río de Janeiro.
- Ornelas-Eusebio, E., Obregón-Ascencio, A., Chávez-Maya, F., García-Espinosa, G., 2015. Molecular characterization of an influenza A virus (H4N2) isolated from waterfowl habitats in the State of Mexico. *J. Vet. Med. Sci.* 77, 365–369. <https://doi.org/10.1292/jvms.14-0267>
- Osbjer, K., Berg, M., Sokerya, S., Chheng, K., San, S., Davun, H., Magnusson, U., Olsen, B., Zohari, S., 2016. Influenza A Virus in Backyard Pigs and Poultry in Rural Cambodia. *Transbound. Emerg. Dis.* <https://doi.org/10.1111/tbed.12547>

- Pantin-Jackwood, M.J., 2014. Immunohistochemical Staining of Influenza Virus in Tissues, in: Spackman, E. (Ed.), *Animal Influenza Virus*. Springer New York, New York, NY, pp. 51–58. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0758-8_5
- Pearson, H.E., Toribio, J.-A.L.M.L., Lapidge, S.J., Hernández-Jover, M., 2016. Evaluating the risk of pathogen transmission from wild animals to domestic pigs in Australia. *Prev. Vet. Med.* 123, 39–51. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.11.017>
- Pedersen, J.C., 2014. Hemagglutination-Inhibition Assay for Influenza Virus Subtype Identification and the Detection and Quantitation of Serum Antibodies to Influenza Virus, in: Spackman, E. (Ed.), *Animal Influenza Virus*. Springer New York, New York, NY, pp. 11–25. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0758-8_2
- Peiris, J.S.M., Guan, Y., Markwell, D., Ghose, P., Webster, R.G., Shortridge, K.F., 2001. Cocirculation of Avian H9N2 and Contemporary “Human” H3N2 Influenza A Viruses in Pigs in Southeastern China: Potential for Genetic Reassortment? *J. Virol.* 75, 9679–9686. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.20.9679-9686.2001>
- Pillai, S.P., Lee, C.W., 2010. Species and age related differences in the type and distribution of influenza virus receptors in different tissues of chickens, ducks and turkeys. *Virol. J.* 7, 5. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-5>
- R Development Core Team, 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.
- Saavedra-Montañez, M., Carrera-Aguirre, V., Castillo-Juárez, H., Rivera-Benitez, F., Rosas-Estrada, K., Pulido-Camarillo, E., Mercado-García, C., Carreón-Nápoles, R., Haro-Tirado, M., Rosete, D.P., Cabello, C., Manjarrez, M.E., Sánchez-Betancourt, I., Ramírez-Mendoza, H., 2013. Retrospective serological survey of influenza viruses in backyard pigs from Mexico City. *Influenza Other Respir. Viruses* 7, 827–832. <https://doi.org/10.1111/irv.12063>
- SAGARPA, 2016. Acuerdo mediante el cual se dan a conocer en los Estados Unidos Mexicanos las enfermedades y plagas exóticas y endémicas de notificación obligatoria de los animales terrestres y acuáticos.
- Sánchez-Betancourt, J.I., Cervantes-Torres, J.B., Saavedra-Montañez, M., Segura-Velázquez, R.A., 2017. Complete genome sequence of a novel influenza A H1N2 virus circulating in swine from Central Bajío region, Mexico. *Transbound. Emerg. Dis.* <https://doi.org/10.1111/tbed.12620>

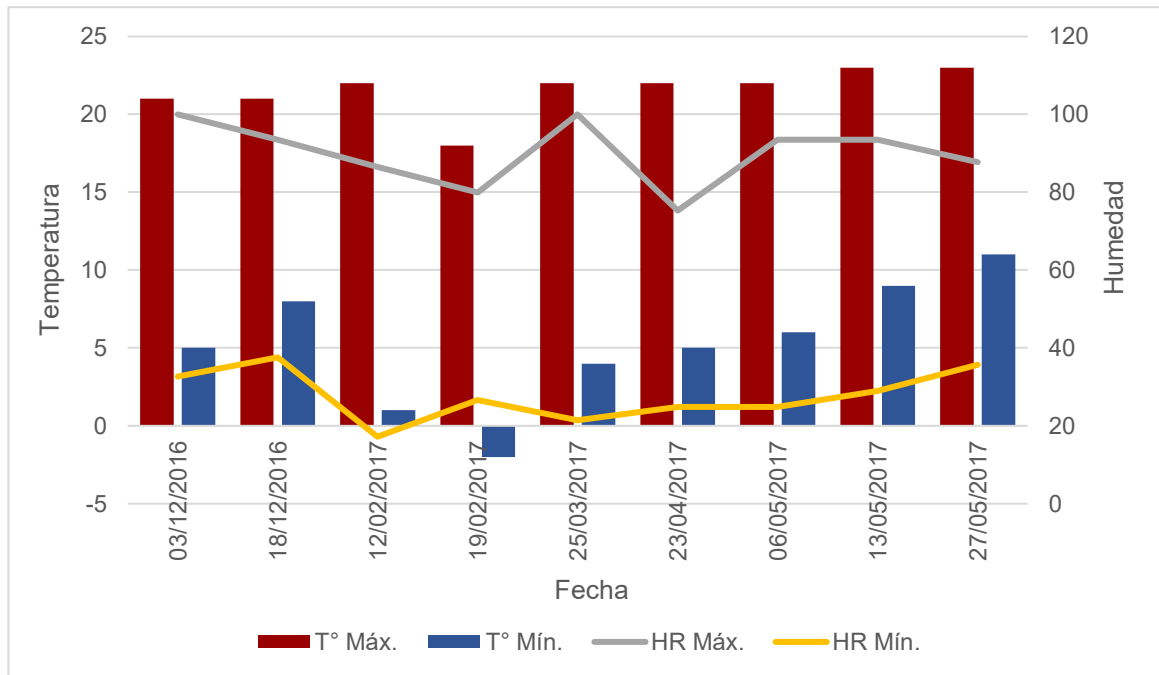
- Sawabe, K., Hoshino, K., Isawa, H., Sasaki, T., Hayashi, T., Tsuda, Y., Kurahashi, H., Tanabayashi, K., Hotta, A., Saito, T., Yamada, A., Kobayashi, M., 2006. Detection and isolation of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses from blow flies collected in the vicinity of an infected poultry farm in Kyoto, Japan, 2004. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75, 327–332.
- SEMARNAT-CONANP, 2017. 182ANP_Geo_ITRF08_Noviembre_2017.
- Shin, J.-Y., Song, M.-S., Lee, E.H., Lee, Y.-M., Kim, S.-Y., Kim, H.K., Choi, J.-K., Kim, C.-J., Webby, R.J., Choi, Y.-K., 2006. Isolation and Characterization of Novel H3N1 Swine Influenza Viruses from Pigs with Respiratory Diseases in Korea. *J. Clin. Microbiol.* 44, 3923–3927. <https://doi.org/10.1128/JCM.00904-06>
- Shope, R.E., 1931. SWINE INFLUENZA: III. FILTRATION EXPERIMENTS AND ETIOLOGY. *J. Exp. Med.* 54, 373–385.
- Short, K.R., Richard, M., Verhagen, J.H., van Riel, D., Schrauwen, E.J.A., van den Brand, J.M.A., Mänz, B., Bodewes, R., Herfst, S., 2015. One health, multiple challenges: The inter-species transmission of influenza A virus. *One Health* 1, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2015.03.001>
- Ssematimba, Amos, Malladi, S., Bonney, P.J., Flores-Figueroa, C., Muñoz-Aguayo, J., Halvorson, D.A., Cardona, C.J., 2018. Quantifying the effect of swab pool size on the detection of influenza A viruses in broiler chickens and its implications for surveillance. *BMC Vet. Res.* 14. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1602-1>
- Ssematimba, A., Okike, I., Ahmed, G.M., Yamage, M., Boender, G.J., Hagenaars, T.J., Bett, B., 2018. Estimating the between-farm transmission rates for highly pathogenic avian influenza subtype H5N1 epidemics in Bangladesh between 2007 and 2013. *Transbound. Emerg. Dis.* 65, e127–e134. <https://doi.org/10.1111/tbed.12692>
- Su, S., Bi, Y., Wong, G., Gray, G.C., Gao, G.F., Li, S., 2015. Epidemiology, Evolution, and Recent Outbreaks of Avian Influenza Virus in China. *J. Virol.* 89, 8671–8676. <https://doi.org/10.1128/JVI.01034-15>
- Su, S., Qi, W. -b., Chen, J. -d., Cao, N., Zhu, W. -j., Yuan, L. -g., Wang, H., Zhang, G. -h., 2012. Complete Genome Sequence of an Avian-Like H4N8 Swine Influenza Virus Discovered in Southern China. *J. Virol.* 86, 9542–9542. <https://doi.org/10.1128/JVI.01475-12>

- Takemae, N., Tsunekuni, R., Uchida, Y., Ito, T., Saito, T., 2018. Experimental infection of pigs with H1 and H3 influenza A viruses of swine by using intranasal nebulization. *BMC Vet. Res.* 14. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1434-z>
- Torremorell, M., Allerson, M., Corzo, C., Diaz, A., Gramer, M., 2012. Transmission of Influenza A Virus in Pigs: Transmission of Influenza Virus in Pigs. *Transbound. Emerg. Dis.* 59, 68–84. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01300.x>
- Tufiño, C., 2013. Caracterización molecular de los virus de influenza A que circulan en cerdos en la región del Bajío Mexicano (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.
- Van Boeckel, T.P., Thanapongtharm, W., Robinson, T., Biradar, C.M., Xiao, X., Gilbert, M., 2012. Improving Risk Models for Avian Influenza: The Role of Intensive Poultry Farming and Flooded Land during the 2004 Thailand Epidemic. *PLoS ONE* 7, e49528. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049528>
- Van Reeth, K., Braeckmans, D., Cox, E., Van Borm, S., van den Berg, T., Goddeeris, B., De Vleeschauwer, A., 2009. Prior infection with an H1N1 swine influenza virus partially protects pigs against a low pathogenic H5N1 avian influenza virus. *Vaccine* 27, 6330–6339. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.03.021>
- Velkers, F.C., Blokhuis, S.J., Veldhuis Kroeze, E.J.B., Burt, S.A., 2017. The role of rodents in avian influenza outbreaks in poultry farms: a review. *Vet. Q.* 37, 182–194. <https://doi.org/10.1080/01652176.2017.1325537>
- Vincent, A., Awada, L., Brown, I., Chen, H., Claes, F., Dauphin, G., Donis, R., Culhane, M., Hamilton, K., Lewis, N., Mumford, E., Nguyen, T., Parchariyanon, S., Pasick, J., Pavade, G., Pereda, A., Peiris, M., Saito, T., Swenson, S., Van Reeth, K., Webby, R., Wong, F., Ciacci-Zanella, J., 2014. Review of Influenza A Virus in Swine Worldwide: A Call for Increased Surveillance and Research. *Zoonoses Public Health* 61, 4–17. <https://doi.org/10.1111/zph.12049>
- Vincent, A.L., Lager, K.M., Anderson, T.K., 2014. A Brief Introduction to Influenza A Virus in Swine, in: Spackman, E. (Ed.), *Animal Influenza Virus*. Springer New York, New York, NY, pp. 243–258. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0758-8_20
- Wang, J., Wu, M., Hong, W., Fan, X., Chen, R., Zheng, Z., Zeng, Y., Huang, R., Zhang, Y., Lam, T.T.-Y., Smith, D.K., Zhu, H., Guan, Y., 2016. Infectivity and Transmissibility of Avian H9N2 Influenza Viruses in Pigs. *J. Virol.* 90, 3506–3514. <https://doi.org/10.1128/JVI.02605-15>

- Wiethoelter, A.K., Beltrán-Alcrudo, D., Kock, R., Mor, S.M., 2015. Global trends in infectious diseases at the wildlife–livestock interface. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 9662–9667. <https://doi.org/10.1073/pnas.1422741112>
- Wikramaratna, P.S., Sandeman, M., Recker, M., Gupta, S., 2013. The antigenic evolution of influenza: drift or thrift? *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 368, 20120200–20120200. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0200>
- Wu, Y., Tefsen, B., Shi, Y., Gao, G.F., 2014. Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends Microbiol.* 22, 183–191. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.01.010>
- Yassine, H.M., Lee, C.-W., Gourapura, R., Saif, Y.M., 2010. Interspecies and intraspecies transmission of influenza A viruses: viral, host and environmental factors. *Anim. Health Res. Rev.* 11, 53–72. <https://doi.org/10.1017/S1466252310000137>
- Yassine, H.M., Lee, C.-W., Saif, Y.M., 2011. Interspecies Transmission of Influenza A Viruses Between Swine and Poultry, in: Richt, J.A., Webby, R.J. (Eds.), *Swine Influenza*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 227–240. https://doi.org/10.1007/82_2011_180
- Yoo, S.J., Kwon, T., Lyoo, Y.S., 2018. Challenges of influenza A viruses in humans and animals and current animal vaccines as an effective control measure. *Clin. Exp. Vaccine Res.* 7, 1. <https://doi.org/10.7774/cevr.2018.7.1.1>
- Zepeda Gómez, C., Nemiga, X.A., Lot Helgueras, A., Madrigal Uribe, D., 2012. Análisis del cambio del uso del suelo en las ciénegas de Lerma (1973-2008) y su impacto en la vegetación acuática. *Investigaciones Geográficas, Boletín del Instituto de Geografía, UNAM* 78, 48–61.
- Zhang, J., Gauger, P.C., 2014. Isolation of Swine Influenza Virus in Cell Cultures and Embryonated Chicken Eggs, in: Spackman, E. (Ed.), *Animal Influenza Virus*. Springer New York, New York, NY, pp. 265–276. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0758-8_22
- Zhang, J., Harmon, K.M., 2014. RNA Extraction from Swine Samples and Detection of Influenza A Virus in Swine by Real-Time RT-PCR, in: Spackman, E. (Ed.), *Animal Influenza Virus*. Springer New York, New York, NY, pp. 277–293. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0758-8_23
- Zhao, L., Niu, Y., Lu, T., Yin, H., Zhang, Y., Xu, L., Wang, Y., Chen, H., 2018. Metagenomic Analysis of the Jinding Duck Fecal Virome. *Curr. Microbiol.* 75, 658–665. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1430-3>

ANEXO 1

Diagrama de la temperatura y humedad relativa registrada en Lerma, Estado de México durante las fechas de muestreo.



Fuente: <https://www.meteored.mx/lerma-de-villada/historico>

ANEXO 2

Información de localidades muestreadas del municipio de Lerma, Estado de México.

Localidad	Población	Viviendas habitadas	Falta de drenaje	Falta de tuberías	Falta de sanitario	UPP
Casa Blanca (Tierras nuevas)	206	42	0%	0%	4.8%	2
Ejido de San Lorenzo Huitzilapan	24	6	0%	0%	0%	13
Santa María Atarasquillo	13,769	3,092	0.3%	0.4%	1.2%	18
Pueblo Nuevo Tlalmimilolpan	1,848	427	8.7%	0.7%	6.6%	2
Colonia Reforma Tlalmimilolpan	1,389	344	1.7%	1.2%	1.5%	13
Santa María Tlalmimilolpan	2,628	608	3.9%	1.0%	4.3%	18

* UPP: Unidades de producción porcina. Fuente: Catálogo de Localidades (SEDESOL, 2010)

ANEXO 3

Colecta de muestras de cerdos de traspatio en granjas del municipio de Lerma, Estado de México.

Fecha de muestreo	Localidad	Granja	N° muestras nasales	N° muestras sanguíneas
03/12/2016	Casa Blanca	Granja 1	35	4
18/12/2016	Santa María Atarasquillo	Granja 2	24	7
12/02/2017	Santa María Atarasquillo	Granja 2	19	19
19/02/2017	Santa María Atarasquillo	Granja 2	13	11
25/03/2017	Santa María Atarasquillo	Granja 3	13	12
23/04/2017	Pueblo Nuevo Tlalmimilolpan	Granja 5	24	20
06/05/2017	Colonia Reforma Tlalmimilolpan	Granja 6	11	11
13/05/2017	Santa María Tlalmimilolpan	Granja 4	21	16
27/05/2017	Ejido de San Lorenzo Huitzilapan	Granja 7	14	15
TOTAL			175	115


























ANEXO 4

Antígenos de virus de influenza utilizados durante la técnica de Inhibición de la Hemaglutinación.

Fecha	ID	Especie	Nombre común	Subtipo
27/11/2016	80	<i>Anas crecca</i>	Cerceta común	H5N2
11/12/2016	377	<i>Anas platyrhynchos diazi</i>	Pato mexicano	H5N2
11/12/2016	322	<i>Spatula discors</i>	Pato cucharón norteño	H1N1
22/01/2017	465	<i>Anas crecca</i>	Cerceta común	H3N2
26/02/2017	613	<i>Spatula clypeata</i>	Pato cucharón norteño	H5N2

ANEXO 5

Valores de Ct del control positivo, controles negativos y de las muestras nasales con hisopo (pool 1 al 32) analizadas por medio de qRT-PCR.

Color	Identificación	Tipo	Ct	Resultado
	Control Positivo Kit	Control positivo	25.03	Positivo
	NTC	Control negativo		Negativo
	Agua libre de nucleasas	Control negativo		Negativo
	Pool 1 - Granja 1	Hisopo nasal		Negativo
	Pool 2 - Granja 1	Hisopo nasal		Negativo
	Pool 3 - Granja 1	Hisopo nasal		Negativo
	Pool 4 - Granja 1	Hisopo nasal		Negativo
	Pool 5 - Granja 1	Hisopo nasal		Negativo
	Pool 6 - Granja 1	Hisopo nasal		Negativo
	Pool 7 - Granja 1	Hisopo nasal		Negativo
	Pool 8 - Granja 2	Hisopo nasal		Negativo
	Pool 9 - Granja 2	Hisopo nasal		Negativo
	Pool 10 - Granja 2	Hisopo nasal		Negativo
	Pool 11 - Granja 2	Hisopo nasal		Negativo
	Pool 12 - Granja 2	Hisopo nasal		Negativo
	Pool 13 - Granja 2	Hisopo nasal	38.69	Sospechoso
	Pool 14 - Granja 2	Hisopo nasal		Negativo
	Pool 15 - Granja 2	Hisopo nasal		Negativo
	Pool 16 - Granja 2	Hisopo nasal		Negativo
	Pool 17 - Granja 2	Hisopo nasal		Negativo
	Pool 18 - Granja 2	Hisopo nasal		Negativo
	Pool 19 - Granja 2	Hisopo nasal		Negativo
	Pool 20 - Granja 3	Hisopo nasal		Negativo
	Pool 21 - Granja 3	Hisopo nasal		Negativo
	Pool 22 - Granja 3	Hisopo nasal		Negativo

	Pool 23 - Granja 4	Hisopo nasal		Negativo
	Pool 24 - Granja 4	Hisopo nasal		Negativo
	Pool 25 - Granja 4	Hisopo nasal		Negativo
	Pool 26 - Granja 4	Hisopo nasal		Negativo
	Pool 27 - Granja 4	Hisopo nasal		Negativo
	Pool 28 - Granja 5	Hisopo nasal		Negativo
	Pool 29 - Granja 5	Hisopo nasal		Negativo
	Pool 30 - Granja 5	Hisopo nasal		Negativo
	Pool 31 - Granja 5	Hisopo nasal		Negativo
	Pool 32 - Granja 5	Hisopo nasal		Negativo

ANEXO 6

Valores de Ct del control positivo, controles negativos y de las muestras nasales con hisopo (pool 33 al 39) analizadas por medio de qRT-PCR.

Color	Identificación	Tipo	Ct	Resultado
	Control Positivo	Control positivo	25.11	Positivo
	NTC	Control Negativo		Negativo
	Agua libre de nucleasas	Control Negativo		Negativo
	Pool 33 – Granja 5	Hisopo nasal		Negativo
	Pool 34 – Granja 6	Hisopo nasal		Negativo
	Pool 35 – Granja 6	Hisopo nasal		Negativo
	Pool 36 – Granja 6	Hisopo nasal		Negativo
	Pool 37 – Granja 7	Hisopo nasal		Negativo
	Pool 38 – Granja 7	Hisopo nasal		Negativo
	Pool 39 – Granja 7	Hisopo nasal		Negativo