



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CARACTERIZACIÓN DE METACOMUNIDADES Y ANÁLISIS DE CO-  
OCURRENCIA EN COMUNIDADES VIRALES DE INFLUENZA TIPO A  
ASOCIADAS A AVES DOMÉSTICAS Y SILVESTRES.

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

PRESENTA:

DANIEL MENDIZABAL CASTILLO

TUTOR PRINCIPAL:

OSCAR RICO CHÁVEZ

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

COMITÉ TUTOR:

IVÁN CASTRO-ARELLANO

TEXAS STATE UNIVERSITY

GERARDO SUZÁN AZPIRI

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO 2019



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.

A mi familia y amigos,  
que aunque nunca lean esta tesis,  
agradezco de todo corazón su apoyo y motivación.

## Agradecimientos

En primera instancia quiero agradecer a mi familia. A mi mamá, Arturo, Eugenio y Alejandra, que aunque nunca tienen ni idea de lo que hago y con lo que trabajo, su apoyo y aguante siempre es fundamental para cumplir mis metas.

A mis asesores y al grupo de Ecología de Enfermedades y Una Salud. Gracias por todos los conocimientos brindados, por siempre estar dispuestos a resolver mis dudas y guiarme durante este proceso. En especial a Fabiola Nieto, quien tuvo la paciencia infinita de explicarme cientos de veces sobre los modelos nulos, los análisis de R, las clases y mis resultados. ¡Estoy seguro que serás una gran asesora!

A mis amigos, que cuando creía que nunca terminaría, ellos fueron quienes me presionaron y motivaron para terminar de escribir esta tesis.

A Jerónimo, por siempre estar a mi lado y ayudarme a resolver mis dudas biológicas-moleculares-genéticas-laborales-existenciales. ¡Me ayudó a ser una mejor persona! Gracias.

A mis alumnos, una de las principales razones por la cual busco prepararme y seguir aprendiendo. Quiero ser el maestro que ellos merecen tener.

A la UNAM y a la FMVZ, en donde llevo casi 10 años, y donde me han brindado la oportunidad de seguir creciendo personal y profesionalmente.

¡Gracias!

## Contenido

<b>RESUMEN</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>7</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>10</b>
<b>CAPÍTULO 1. TEORÍA DE METACOMUNIDADES Y ANÁLISIS DE CO-OCURRENCIA EN ECOLOGÍA.</b>	<b>23</b>
<b>CAPÍTULO 2. METACOMMUNITY AND CO-OCCURRENCE ANALYSIS OF INFLUENZA A VIRUS IN BIRDS</b>	<b>39</b>
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b>	<b>65</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>72</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>74</b>

## Resumen

En los últimos años el estudio de comunidades de patógenos ha adquirido una gran importancia para comprender las dinámicas patógeno-hospedero, y los factores epidemiológicos y ecológicos relacionados. La importancia de esta área es conocer los procesos macro ecológicos que influyen en los patógenos y su subsecuente diseminación a nuevas áreas geográficas y a nuevos hospederos, incluyendo al ser humano. Dos herramientas de gran utilidad para el estudio de dichos procesos son la teoría de metacomunidades y el análisis de co-ocurrencias. La teoría de metacomunidades busca comprender los factores que afectan a las comunidades y la manera en que se estructuran, para darnos un mejor contexto de los factores ecológicos que influyen. Por otro lado el análisis de co-ocurrencia busca conocer como las especies presentes en una comunidad están relacionadas y si estas interacciones son positivas, negativas o neutrales.

Un modelo de gran utilidad para estos estudios es el virus de la influenza tipo A, un patógeno de gran importancia para la salud pública y animal, así como en los aspectos económicos y políticos. A pesar de que este patógeno ha sido ampliamente estudiado, aun se desconocen aspectos relacionados con su macroecología.

En el presente proyecto se buscó conocer como se estructuran las metacomunidades del virus de influenza tipo A, así como la co-ocurrencia de los diferentes subtipos en las especies de aves, en diferentes zonas zoogeográficas. Utilizando la base de datos Influenza Research Database, de la NCBI, se obtuvieron 188,412 registros de 241 especies de aves hospederas, las cuales se agruparon en 11 regiones zoogeográficas. Para el análisis de metacomunidades se obtuvieron estructuras anidadas en las regiones paleártica, oriental y sino-japonesa, así como a nivel mundial; mientras que en el análisis de co-ocurrencia se presentaron asociaciones positivas entre prácticamente todos los subtipos analizados.

De acuerdo al análisis de metacomunidades las estructuras anidadas están asociadas a sesgos en el muestreo, debido a que gran parte de las muestras

pertenecen a dos especies de aves, *Anas platyrhynchos* y *Gallus gallus domesticus*. Es por ello que se requiere modificar la forma en que estamos estudiando el virus de influenza, pues debemos de realizar estudios más integrales que nos permitan conocer con mayor precisión el papel que juegan otras aves, incluyendo aves terrestres en la transmisión y evolución del virus de influenza. En el caso del análisis de co-ocurrencias, las asociaciones positivas indican que existen procesos de coinfección entre los diferentes subtipos de influenza. Esto favorece el reordenamiento y la subsecuente formación de nuevos subtipos, muchos de ellos de posible carácter zoonótico. Dentro de la asociación de subtipos encontramos que aquellos considerados zoonóticos son los que co-ocurren en mayor medida, lo que pudiera indicar un proceso de recombinación que influye en la patogenicidad y virulencia del subtipo.

Por lo anterior es importante conocer la variedad de subtipos de influenza y los hospederos en los que se encuentran para poder así desarrollar estrategias más precisas de vigilancia y monitoreo. Es importante que comencemos a realizar estudios que sean más integrales y que busquen comprender a los diferentes elementos que conforman a un sistema, como un todo, y así poder conocer con mayor profundidad las dinámicas ecológicas que representan estos sistemas.

## Abstract

In the last years the study of pathogen communities has been of big concern for understanding pathogen-host dynamics, and the epidemiological and ecological factors related to it. Studying macro ecological processes of pathogen will allow us to understand their dissemination to new geographic areas and to new hosts. Two important tool that can help us study these processes are the metacommunity theory and co-occurrence analysis.

Metacommunity theory aims to understand factors that affect pathogen community and the way this communities are structured. This can help us understand ecological factors that are related to these structures. Co-occurrence analysis studies how species interact in a given community and if these interactions are positive, negative or neutral.

Avian influenza virus (AIV) is an important model for this type of studies. It is a pathogen of great importance in public health and the poultry industry, however we still haven't figure out the ecological patterns that act at bigger scales, as well as its ecology and epidemiology.

In this study we want to know how AIV communities are structured, as well as how subtypes are co-occurring in different bird species at global and regional scales. Using Influenza Research Database we obtained 188,412 records of 241 species, grouped in 11 zoogeographic regions. The metacommunity and co-occurrence analysis were made using free software R. In the co-occurrence analysis positive associations were found between pairs of AIV subtypes; and for metacommunities, in the palearctic, oriental and sino-japanese regions, as well as worldwide, quasi-clumped species loss nested structures were presented. This results indicate that different influenza subtypes are being presented in the same bird species, which can favor a process of coinfection that may lead to genetic reassortment and the generation of new genotypes, some of them with zoonotic potential. However according to our metacommunity analysis the nested structures are associated with a sample bias, mainly due to an over sampling of *Anas platyrhynchos* and *Gallus gallus domesticus*. It's important to modify how surveillance is being made



so we can have a greater overview on the ecological factors involving AIV, and developing better surveillance and monitoring programs.

We conclude that studying viral diversity and the hosts associated to it will let us develop more precise strategies for surveillance and monitor. It is important to study these systems in a more integrated framework, with the objective of understanding the ecological processes in an holistic way. This will allow us to get a better picture of how systems in nature work and the interconnectedness of everything.

# Objetivos

## General

Conocer como se estructuran las metacomunidades de Influenza tipo A en aves, en las diferentes regiones zoogeográficas, y si dichas estructuras está relacionada con los patrones de co-ocurrencia que presentan los diferentes subtipos del virus.

## Específicos

Realizar una revisión sobre los modelos nulos, principalmente sobre la teoría de metacomunidades y el análisis de co-ocurrencia para conocer la utilidad de estos análisis en el estudio de ecología de comunidades.

Realizar el análisis de metacomunidades y de co-ocurrencia con la información recabada sobre los subtipos de influenza tipo A identificados en aves domésticas y silvestres, en las diferentes regiones zoogeográficas para conocer los patrones e interacciones que existen entre el virus y sus hospederos.

## Introducción

Desde tiempos antiguos el ser humano se ha enfrentado a un sin fin de agentes infecciosos y enfermedades que han producido millones de muertes y grandes pérdidas económicas. Como ejemplos tenemos a la rabia que fue descrita en Mesopotamia en perros de caza en el 2,300 AC, o la Peste Negra en el siglo XIV en Asia, África y Europa (Kruse, Kirkemo, and Handeland 2004). Actualmente continúan ocurriendo cientos de brotes de diversas enfermedades emergentes alrededor del mundo, siendo la gran mayoría de carácter zoonótico, como es el caso de la epidemia del síndrome respiratorio de Medio Oriente en 2012 (CDC 2014), o la influenza H1N1 en 2009 en México (CDC 2010). El 75% de las enfermedades zoonóticas emergentes tienen su origen en fauna silvestre (VanWormer 2013). Esto se asocia principalmente a factores antropogénicos como son: el crecimiento desmesurado de la población humana, el cambio climático, la fragmentación del hábitat, cambios de uso de suelo, entre otros, provocando una mayor interacción entre el ser humano y los animales silvestres. Debido a lo anterior, los patógenos, vectores y hospederos han sufrido cambios en su ecología, favoreciendo la emergencia o reemergencia de enfermedades (Kruse, Kirkemo, and Handeland 2004).

Los cambios ambientales ocasionados por el ser humano, tales como la pérdida y la fragmentación del hábitat, alteran la biodiversidad e irrumpen la función de los ecosistemas (Dirzo et al. 2014). Las alteraciones de los ecosistemas debido a actividades antropogénicas favorecen que existan cambios en la dinámica de las comunidades, incluyendo a las comunidades de patógenos (Suzan et al. 2015). Estos cambios alteran las dinámicas ecológicas y evolutivas de las comunidades, aumento en la abundancia de hospederos competentes, cambios en las interacciones entre patógenos, incremento en la distribución y riesgo de emergencia de nuevos patógenos, y la alteración en la dinámica de dispersión y transmisión de enfermedades (Suzan et al. 2015; Foley et al. 2005). Es por lo anterior que en los últimos años, debido a las alteraciones antropogénicas, el estudio de comunidades de patógenos ha adquirido una gran importancia para

lograr comprender las dinámicas patógeno-hospedero, asociadas a dichos cambios antropogénicos (Mihaljevic 2012). Entre los patógenos más estudiados a nivel mundial es el virus de la influenza. Este agente es de gran importancia debido a su potencial pandémico y al interés económico en las producciones avícolas. Comprender las dinámicas que tiene este agente con sus hospederos, así como las interacciones ecológicas serán de gran ayuda para el desarrollo de programas de vigilancia epidemiológica.

### *El virus de influenza*

El virus de influenza pertenece a la familia Orthomyxoviridae. Se clasifica en cuatro géneros influenzavirus A, B C y D, siendo los tipos B y C los que afectan directamente al humano (Shao et al. 2017). Los diferentes subtipos se diferencian mediante las variaciones antigénicas en la proteína de la matriz (M1) y en la nucleoproteína (NP) (García-García and Ramos 2006; Su et al. 2017). Dentro de los géneros de influenza, el tipo A es uno de los de mayor importancia pues representan una amenaza constante para la salud pública y la salud alimentaria debido a las infecciones estacionales y a su potencial pandémico (Horman et al. 2018).

Los IA se encuentran distribuidos a nivel mundial, y han sido aislados de una gran cantidad de especies, incluyendo humanos, cerdos, caballos, hurones, felinos, mamíferos marinos y una gran variedad de aves silvestres (Olsen et al. 2006). Este agente ha sido identificado en al menos 105 especies de aves silvestres de 26 familias diferentes, siendo las aves acuáticas, del orden Anseriformes y Charadriiformes, los principales reservorios naturales del virus (García-García, J., 2006). Su relación con las aves acuáticas está asociada a la proximidad existente entre los individuos que forman a las comunidades, la distribución geográfica de las especies y los patrones migratorios. Las características conductuales y de alimentación de las aves acuáticas, favorecen de igual modo la transmisión y dispersión del virus (Reperant, Kuiken, and Osterhaus 2012; Olsen et al. 2006), y pueden actuar como amplificadores locales del agente al migrar a sitios donde existan poblaciones de inmunológicamente incompetentes (Bodewes and Kuiken

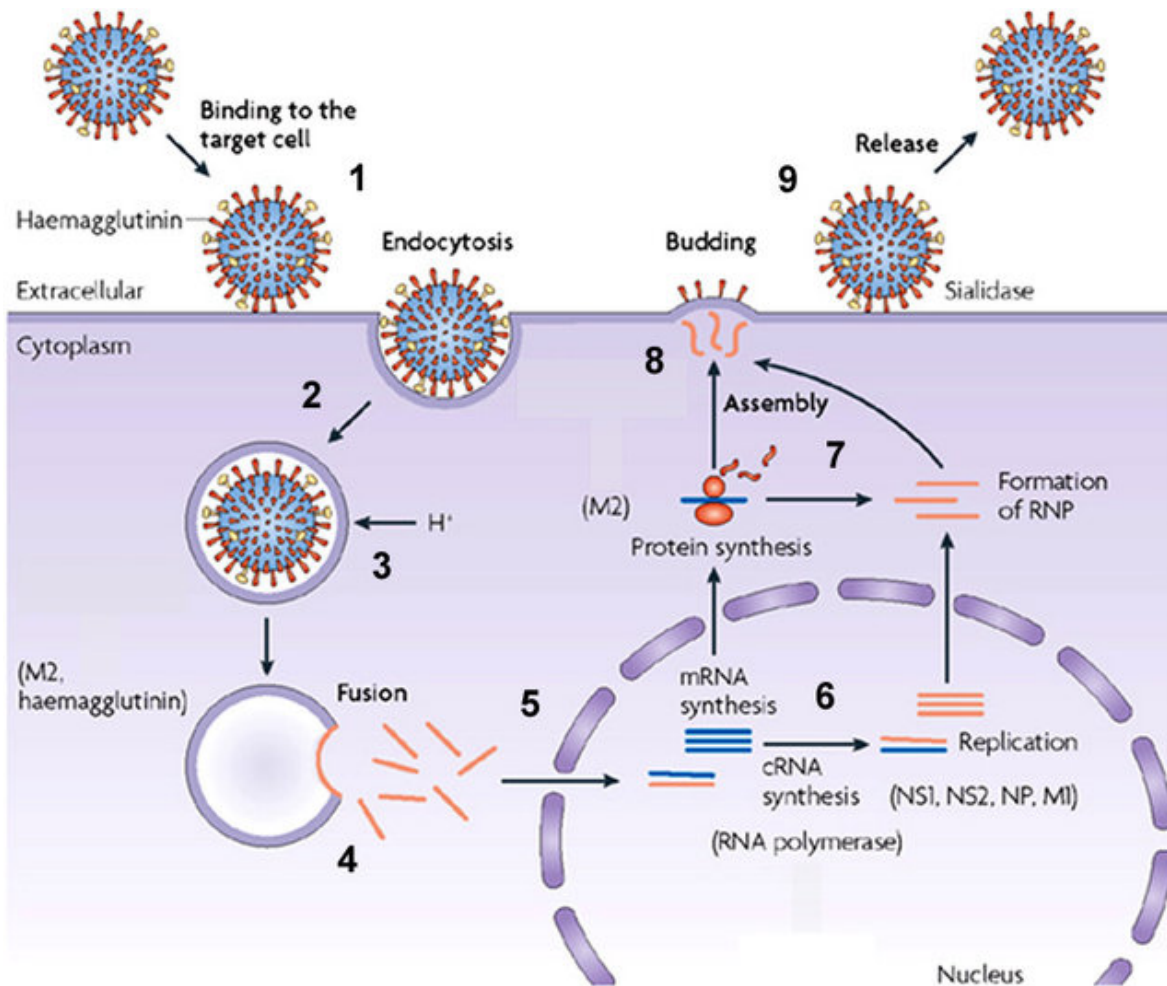
2018).

El virus de IA posee una gran diversidad antigénica y genética, asociada a diferentes procesos de reordenamiento, recombinación y mutación (Shao et al. 2017). El virus de IA presenta una estructura pleomórfica o esférica, que contiene un genoma de 8 segmentos de RNA de cadena sencilla y polaridad negativa, que codifica para 11 proteínas, 9 proteínas estructurales y 2 proteínas no estructurales (Abbas and Abidin 2013). Las 9 proteínas estructurales son la hemaglutinina (HA), neuroaminidasa (NA), proteína de matriz (M1), proteína del canal de iones (M2), proteína nuclear (NP), subunidad polimerasa (PA) y complejo RNA polimerasa (PB1, PB1-F2 y PB2); y las dos proteínas no estructurales son NS1 y NS2 (Shao et al. 2017). Estos virus se dividen en diferentes subtipos de acuerdo a las dos glicoproteínas de superficie que presentan, la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA) (Olsen et al. 2006). Actualmente se han identificado 18 subtipos de HA y 11 subtipos de NA, dando lugar a más de 120 combinaciones de estas proteínas (Shao et al. 2017; Alexander 2007).

La proteína HA juega un papel muy importante en el establecimiento de las infecciones virales. La HA es una proteína de membrana y el principal antígeno de superficie del virus de influenza. Esta proteína se une al ácido siálico de la célula hospedera y está relacionada con la especificidad que presenta el virus con el hospedero. La HA de subtipos adaptados a humanos reconoce la posición terminal  $\alpha$ -2,6 del ácido siálico en la célula hospedera, mientras que los subtipos específicos de aves presenta especificidad a la porción  $\alpha$ -2,3. En un inicio esta proteína se presenta como un precursor HA0, el cual al hidrolizarse forma el dímero HA1-HA2, en donde el HA1 se une a los receptores celulares, y el HA2 regula la fusión del virus a la membrana para favorecer la invasión a la célula hospedera (**Figura 1**) (Shao et al. 2017).

Así mismo la NA es una glicoproteína de membrana y el segundo mayor antígeno de superficie. Presenta una actividad enzimática que promueve la dispersión de la progenie viral hacia otras células del hospedero. Al igual que la HA, la NA es altamente mutable en respuesta a la presión inmune del hospedero. Por su parte la proteína NP y el complejo RNA polimerasa se unen al RNA viral y forman al

vRNP el cual contiene al complejo proteico RNA, la unidad básica de replicación del virus de influenza (Shao et al. 2017).



**Figura 1.** Replicación del virus de influenza. La unión del virus de IA a la célula hospedera (1) es mediada por la HA. El virus es internalizado por endosomas (2), y con la acidificación (3), la HA modifica su conformación para unirse a la membrana endosomal (4). El genoma nuclear entra al núcleo (5) donde se replica y duplica (6). HA, NA y M2 se sintetizan en el retículo endoplásmico, y el resto de los componentes en el citosol (7). Las subunidades virales son ensambladas y se liberan la nueva progenie viral (8 y 9).

Tomado de Scolari, S., Engel, S., Krebs, N., Plazzo, A. P., De Almeida, R. F., Prieto, M., Veit, M., Herrmann, A. (2009). Lateral distribution of the transmembrane domain of influenza virus hemagglutinin revealed by time-resolved fluorescence imaging. *The Journal of biological chemistry*, 284(23), 15708-16.

## *Subtipos de influenza y patogenicidad*

La mayoría de los subtipos de influenza son considerados de baja patogenicidad (LPIV por sus siglas en inglés), afectando el tracto respiratorio y digestivo de los individuos, provocando una leve signología clínica en los hospederos. Sin embargo algunos subtipos son considerados de alta patogenicidad (HPIV por sus siglas en inglés), generados por mutaciones en los subtipos H5 y H7, llegando a producir afectaciones en órganos viscerales, sistema nervioso y sistema cardiovascular con tasas de mortalidad de hasta el 100% en aves domésticas (García-García and Ramos 2006; Shao et al. 2017).

La evolución de LPIV a HPIV es un proceso multifactorial que requiere de la mutación en diferentes proteínas (como son PB2, PB1 y NP). Esta evolución está altamente relacionado con la adquisición de múltiples aminoácidos en el sitio de anclaje HA0. Estas mutaciones permiten que el trímero HA1-HA2 pueda diseminarse en el hospedero de manera sistémica. De igual forma se ha observado que el balance HA-NA que presenten los subtipos puede favorecer la expresión de genotipos de alta patogenicidad (Diederich et al. 2015). HAs de sitio monobásico se anclan por acción de proteasas tipo tripsina, las cuales tienen una ubicación específica en *G. gallos domesticus*, y limitan la dispersión del virus al tracto respiratorio y gastrointestinal en esta especie. Por el contrario, HAs con sitios multibásicos se anclan por proproteínas convertasas, como la furina, las cuales se encuentran expresadas en todo el organismo, favoreciendo una diseminación sistémica (Bodewes and Kuiken 2018).

La transmisión de LPIV de aves silvestres a domésticas puede darse de manera directa o indirecta, siendo las aves acuáticas los individuos más propensos a favorecer esta transmisión (Alexander 2007). Los subtipos LPAIV se replican principalmente en el tracto gastrointestinal de patos, por lo que su transmisión ocurre por la ruta fecal-oral. Se ha identificado que a pesar de que la infección de LPAIV en patos es asintomática, si tiene una influencia directa el peso corporal y en el rendimiento de las aves (Bodewes and Kuiken 2018). Estos subtipos son liberados en grandes concentraciones en las heces, y pueden permanecer viables en agua durante mucho tiempo dependiendo de la temperatura, pH y salinidad. Es

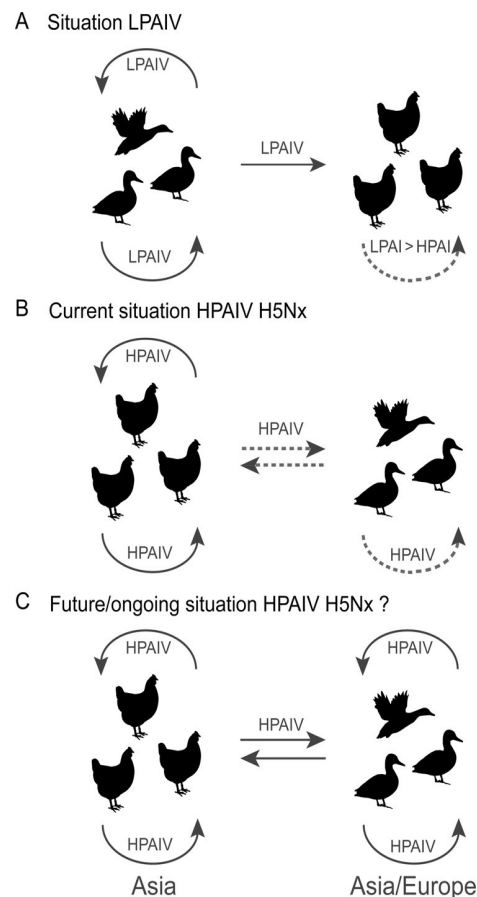
por ello que los cuerpos de agua como reservorio ambiental juegan un papel muy importante en la transmisión de LPAIV (Bodewes and Kuiken 2018). Nuevas técnicas de secuenciación genómica han demostrado que en estos sitios existe circulación de múltiples subtipos de IA y por lo tanto ocurren procesos de recombinación. Sin embargo se ha visto que en los subtipos de LPAIV las tasas evolutivas son significativamente menores que en H5N1, un subtipo de alta patogenicidad (Dugan et al. 2008; Bodewes and Kuiken 2018). La transmisión de LPAIV proveniente de aves acuáticas a aves productivas ocurre regularmente en temporadas específicas. Sin embargo, estos brotes son limitados en tiempo y espacio, y su impacto en la industria avícola es limitado (Bodewes and Kuiken 2018).

La migración de aves acuáticas es uno de los principales factores de la diseminación del virus de IA a diferentes regiones del planeta. Se ha especulado que el subtipo H5N1 de HPAIV se originó en aves domésticas y silvestre en la región de Qinghai, China, y rápidamente se diseminó en 2005-2006 a Europa, India, Medio Oriente, y el norte y centro de África. El mismo proceso ocurrió con los brotes de los subtipos H5N8 en Corea del Sur en 2016, y el H5N2 en América del Norte. En estas situaciones se especuló que las aves silvestres jugaron un rol muy importante en la transmisión y diseminación de estos agentes (Bodewes and Kuiken 2018).

En lo mencionado anteriormente, la transmisión de aves silvestres a domésticas ha sido la vía mayormente estudiada. Sin embargo, en los últimos años la transmisión de aves domésticas a aves silvestres ha adquirido un mayor interés para conocer con mayor profundidad la epidemiología de este agente. La transmisión puede ocurrir por contacto indirecto o contacto directo, siendo las granjas cercanas a sitios de anidación o reproducción, los lugares más comunes donde se puede dar la infección. La diseminación a través del aire también es un medio importante para que aves silvestres se vean infectadas, puesto que se ha identificado que el virus puede alcanzar un radio de hasta 60 metros (Bodewes and Kuiken 2018). La importancia de conocer esta ruta de transmisión radica también en el hecho de que se han registrado casos de aves silvestres infectadas



con subtipos de alta patogenicidad, donde han producido la muertes de cientos e incluso miles de aves silvestres en diferentes países. Entre los principales casos tenemos el brote de H5N1 en Hong Kong que ocasionó la muerte de especies de aves acuáticas y otras especies como *Phoenicopterus ruber*, *Egretta garzetta* y *Ardea cinerea* (Trevor et al. 2010); así como el brote de H5N8 de 2016 en Holanda, que afecta alrededor de 13,600 especies de aves, la mayoría *Aythya fuligula* y *Anas penelope* (Kleyheeg et al. 2017). Se ha demostrado que dichos eventos ocurrieron por una posible transmisión de HPAIV provenientes de aves domésticas (**Figura 2**) (Bodewes and Kuiken 2018).



**Figura 2.** Circulación del virus de IA de alta patogenicidad y de baja patogenicidad en aves. Flechas sólidas curvas: circulación continua entre aves acuáticas o domésticas. Flechas punteadas curvas: circulación temporal entre aves acuáticas o domésticas. Flechas sólidas rectas: transmisión regular de aves domésticas a acuáticas, o viceversa. Flechas punteadas rectas: transmisión ocasiones de aves domésticas a acuáticas, o viceversa. Tomado de: Bodewes R, Kuiken T. Changing Role of Wild Birds in the Epidemiology of Avian Influenza A Viruses. Adv Virus Res. 2018;100:279-307.

## *Evolución del virus de influenza*

Al igual que en las demás especies e individuos, el virus de la influenza provienen de un ancestro en común a partir de cual se originaron los diferentes subtipos (Taubenberger 2010). Actualmente existen dos modelos evolutivos que buscan explicar la gran diversidad del virus de IA, uno de ellos se enfoca en un proceso de especiación alopátrica y el otro en una especiación simpátrica. Bajo el modelo alopátrico los subtipos HA y NA corresponden a linajes virales producto de un aislamiento geográfico, lo cual resulta en una acumulación de cambios y mutaciones que llevan al surgimiento de diferentes subtipos. En el modelo simpátrico, los subtipos HA y NA se originaron dentro de la misma población espacial, sin embargo la selección natural provocó la “separación” de subtipos similares y de esta manera se produjera la especiación de los diferente subtipos (Dugan et al. 2008).

A pesar de la gran diversidad de subtipos que presenta el VIA, algunos estudios topológicos han demostrado que algunos subtipos tanto de HA como de NA presentan una mayor similitud entre ellos, lo que los lleva a formar grupos (Ej. (H1, H2, H5 y H6 son muchos más similares entre ellos; y H7, H10 y H15 son más similares entre ellos). Así mismo, estas proteínas de superficie, HA y NA, presentan una menor diversidad intrasubtípica y una mayor divergencia intersubtípica. Estudios han demostrados que las otras proteínas que componen al virus de IA son altamente conservadas bajo diferentes procesos de selección (Taubenberger 2010). Dentro de estas divergencias tenemos que la HA presenta una diversidad intersubtípica de 45.5% y una similitud intrasubtípica del 92%. Sin embargo ciertos pares de subtipos como H4 vs. H14, H7 vs. H15, H13 vs. H16 y H2 vs. H5, presentan una menor divergencia (79%), indicando que el proceso de especiación es más reciente (Dugan et al. 2008). Una situación similar ocurre con la NA, en donde entre diferentes subtipos existe una similitud de 43.6%, mientras que dentro del mismo subtipo existe una similitud del 89% (Dugan et al. 2008).

Existen tres mecanismos bajo los cuales un cambio evolutivo puede ocurrir en los virus de influenza: mutación, reordenamiento y recombinación. Estos mecanismos pueden influir en la especificidad de hospedero que tendrá el virus y en su

patogenicidad (Shao et al. 2017). Estos procesos ocurren usualmente al momento de coinfecciones entre dos o más subtipos de influenza, donde las proteínas de superficie HA y NA, se reordenan e intercambian dando lugar a nuevas cepas y/o subtipos (Dugan et al. 2008). Estos procesos están relacionados con la proporción de hospederos susceptibles, tasas evolutivas y presiones selectivas actuando sobre los genes.

Uno de los procesos que favorece la evolución del virus de influenza son las mutaciones significativas en sitios antigénicos. Los virus de IA son altamente dinámicos con tasas elevadas de mutación, que van de  $1 \times 10^{-3}$  a  $8 \times 10^{-3}$  sustituciones por sitio por año, aproximadamente (Taubenberger 2010). Estas mutaciones modifican los aminoácidos de porciones antigénicas de las proteínas HA y NA, brindándole ventajas selectivas al virus, tal como es la evasión de la respuesta inmune del hospedero, donde cambios estructurales mínimos producen una nueva variante viral que el sistema inmune del hospedero y así se logra la colonización del patógeno (Shao et al. 2017). En la influenza humana este procesos ocurre con mayor medida debido a las fuertes presiones inmunológicas de la población (Taubenberger 2010).

En el reordenamiento ocurre un intercambio de segmentos de RNA entre dos diferentes subtipos de influenza que se encuentran coinfectando a una misma célula (Nelson 2007). El virus de la influenza presenta un genoma segmentado, por lo que al momento de la replicación viral pueden ocurrir errores en la RNA polimerasa lo que permite el intercambio de segmentos entre los dos subtipos (principalmente de aquellos con los que presenta una mayor relación) (de Silva et al. 2012) y la posible formación de nuevas cepas y/o subtipos, ante los cuales la población es inmunológicamente ingenua (Shao et al. 2017; Taubenberger 2010). El proceso de reordenamiento ocurre constantemente en las infecciones por influenza, sin embargo muchas veces este proceso no produce cambios fuertes y llega a ser indetectable (Nelson 2007). En otras ocasiones, cuando los cambios son lo suficientemente fuertes, ocurre la generación de nuevas cepas o subtipos, favoreciendo que estos tengan la capacidad de soportar distintas presiones evolutivas, infectar a nuevos hospederos, evadir la respuesta inmune o resistir

fármacos (Lu, Lycett, and Leigh Brown 2014).

La coexistencia de los diferentes subtipos dentro de un mismo hospedero puede estar asociada a la falta de inmunidad heterosubtípica y reacciones de protección cruzada. Al ocurrir esto, los subtipos poco comunes presentarán una menor competencia y se favorece así que existan procesos de coinfección en poblaciones de aves silvestres (Lu, Lycett, and Leigh Brown 2014; Ferguson, Galvani, and Bush 2003). En este caso sería de gran interés, y utilidad, y conocer la frecuencia en que estas coinfecciones ocurren en ambientes naturales, y la influencia que tienen sobre la salud de los hospederos y su posible diseminación a otras especies. Se ha visto que las coinfecciones ocurren en mayor medida entre subtipos que presentan diferentes proteínas HA y NA, y que los subtipos “raros” tienden a presentarse en mayor medida en estas coinfecciones debido a la ventaja de sobrevivencia que pudieran llegar a tener (Sharp et al. 1997).

La coexistencia de múltiples linajes virales en una escala temporal y espacial limitada es conocida y bastante frecuente (Nelson 2007). Estudios demuestran la coinfección por dos o incluso hasta tres subtipos diferentes de influenza en una sola muestra (Sharp et al. 1997). Aquellos subtipos mejor adaptados a una población de aves serán capaces de replicarse con mayor rapidez. Sin embargo si dos subtipos adaptados a una población coinfectan a un mismo individuo en diferente tiempo, el primer subtipo podría evitar el crecimiento del segundo subtipo. De esta forma podríamos tener una baja representación de los subtipos coinfectantes (Sharp et al. 1997).

### *Transmisión zoonótica del virus de influenza*

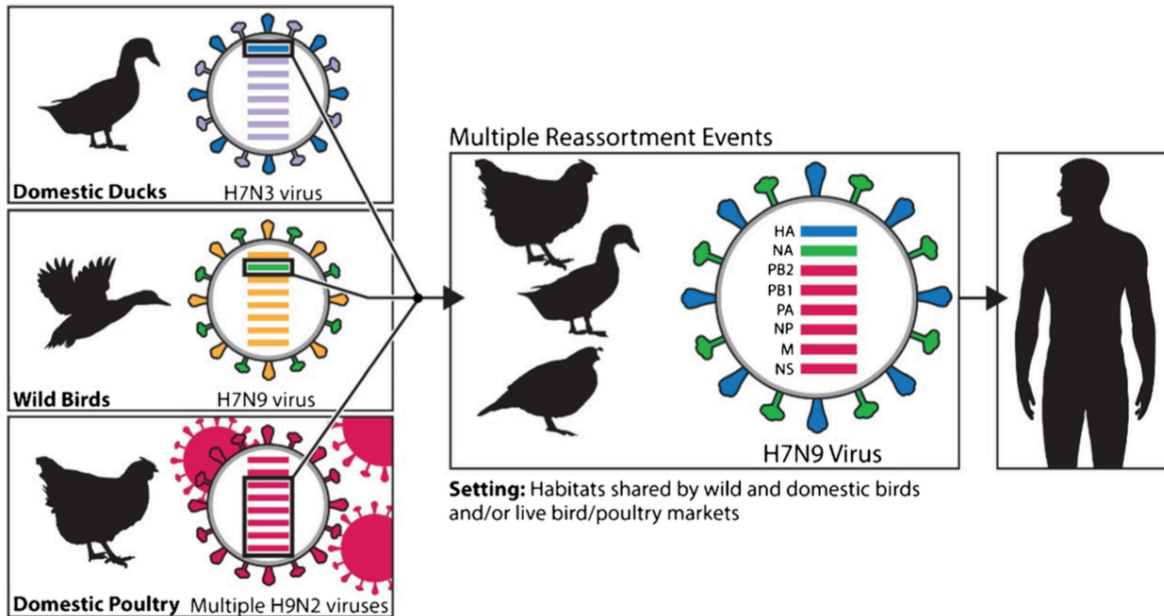
En ocasiones algunos subtipos de influenza pueden infectar a otras especies, incluyendo al ser humano, sin embargo la transmisión entre individuos se ve limitada por la inmunidad de los hospederos. La transmisión de IA al ser humano genera fuertes problemas en salud pública, afectando anualmente entre 250 y 500 mil personas (De Graaf and Fouchier 2014). En los últimos 100 años se han identificados cuatro pandemias asociadas al virus de IA: la pandemia española por H1N1 en 1918; la pandemia asiática por H2N2 en 1957; la H3N2 Hong Kong en

1968; y la pandemia de 2009 que inició en México por H1N1 (Sorrell et al. 2011). Para que un virus pueda infectar a un nuevo hospedero, incluyendo al ser humano, el virus primero tiene que atravesar diferentes barreras a nivel celular para favorecer el anclaje y la replicación, evadir la respuesta inmune del hospedero, y tener la capacidad de transmitirse e infectar a otros individuos (Capua and Munoz 2013). En el caso de los subtipos de IA que pueden llegar a infectar a aves domésticas se ha propuesto que algunas especies terrestres como codornices y pavos pueden actuar como especies puente o amplificadores, y favorecer la transmisión del virus (Capua and Munoz 2013).

La transmisión de IA a humanos es un proceso multifactorial que involucra la capacidad del virus de infectar al humano, la interacción con la célula y el hospedero, y la subsecuente transmisión entre humanos (Reperant, Kuiken, and Osterhaus 2012). Para que esto ocurra el virus requiere establecer un correcto sitio de anclaje para la HA, es decir cambiar el sitio de  $\alpha$ -2,3-Gal a  $\alpha$ -2,6-Gal, lo que le permite fusionarse con la célula del hospedero humano; sitio de enclaje multi-básico (MBCS) que le confiere la capacidad de infectar un mayor número de células; y la habilidad de la proteína NS1 para permitir evadir la respuesta inmune. Sin embargo existen diferentes factores inherentes al hospederos que pueden prevenir las infecciones por VIA, como es la proteína transmembranal inducida por interferones (IFITM), que controla la replicación viral (Horman et al. 2018).

Los procesos de mutación y reordenamiento influyen en la patogenicidad y virulencia de los subtipos, así como en la especificidad de hospedero que tendrán. Por lo tanto, estas variaciones genéticas y los cambios que conllevan pueden alterar el comportamiento del agente pudiendo brindarle un potencial pandémico (Shao et al. 2017). Un claro ejemplo es el estudio realizado en torno al recambio de caso del H9N2 de baja patogenicidad a uno de alta patogenicidad, como consecuencia de procesos de reordenamiento con H5N6, H7N9 y H10N8 (**Figura 3**) (Shao et al. 2017). Así mismo, el reordenamiento de subtipos de influenza ha producido subtipos con un impacto pandémico para la población, tal es el caso de dos de las tres pandemia del siglo pasado, la de 1957 (H2N2) y de 1968 (H3N2) (Nelson 2007; Taubenberger 2010). Por otro lado se ha observado que en

procesos de coinfección, subtipos de alta patogenicidad, como es el caso de H7N1, pueden ser atenuados y disminuir su patogenicidad al reordenarse con otros subtipos de influenza, incluyendo aquellos de caballo, cerdo o humano (Diederich et al. 2015).



**Figura 3.** Evolución genética del virus H7N9 en China, 2013. Los ocho segmentos del virus H7N9 están relacionados con virus IA de aves silvestres, patos domésticos y gallinas domésticas en Asia. Cada segmento es representación por una línea horizontal. H7N9 obtuvo su HA de patos domésticos, su NA de aves silvestres, y los seis segmentos restantes de múltiples H9N2 de gallinas domésticas.

Tomado de Goneau LW, Mehta K, Wong J, L'Huillier AG, Gubbay JB. (2018). Zoonotic Influenza and Human Health—Part 1: Virology and Epidemiology of Zoonotic Influenzas. *Current Infectious Disease Reports*. 20(10): 37.

La importancia de estudiar este agente radica en el hecho de que es un virus que afecta a la industria avícola, que algunos subtipos presentan un potencial pandémico y zoonótico (H5 y H7), y al impacto que en los últimos años ha tenido en la conservación de aves silvestres. Y a pesar de que es un agente que se ha estudiado con gran detenimiento y profundidad todavía existen muchos huecos en el conocimiento de su epidemiología, principalmente en como se comporta este patógeno en escalas regionales mayores. Los estudios sobre la ecología de patógenos rara vez buscan conocer la incidencia de patógenos entre diferentes

comunidades o regiones. Y esto es de gran importancia para conocer los mecanismos que estructuran el ensamblaje de especies, y conocer como la distribución de especies hospederas en diferentes comunidades facilitará el conocimiento sobre la distribución de los patógenos que las afectan. Entender lo anterior nos brindará las bases para conocer como las características de una región influyen en la emergencia de enfermedades infecciosas y actuar con mayor precisión al momento de surgir brotes que afectan la salud humana, animal y ecosistémica.

Es por lo anterior que se requieren realizar estudios a mayores escalas en las cuales se busque conocer la relación que tiene el virus de IA con la ecología, distribución y características de las aves hospederas, con el objetivo de conocer las dinámicas patógeno-hospedero y poder desarrollar programas de monitoreo más eficientes y certeros enfocados a las especies de importancia epidemiológica. De igual forma es importante conocer como se relacionan los diferentes subtipos de influenza en diferentes escalas geográficas, así como las interacciones que ocurren dentro de un mismo hospedero, ya que nos brindarán las bases para comprender los procesos que influyen en la dispersión y diseminación de la IA, y realizar así una vigilancia epidemiológica adecuada para la prevención de posibles brotes pandémicos. Cambios en la dispersión, colonización, extinciones locales, e interacciones bióticas pueden alterar la ocurrencia de reservorios, vectores o patógenos. Estos patrones pueden ser modelados con diferentes herramientas que ayudarán al manejo de enfermedades en las poblaciones y comunidades silvestres. Entre estos métodos tenemos a las metacomunidades y el análisis de co-ocurrencia.

# **Capítulo 1. Teoría de metacomunidades y análisis de co-ocurrencia en ecología.**



## *Modelos nulos en ecología*

Uno de los principales retos en ecología es el comprender como cambian las comunidades en diferentes escalas temporales y espaciales (Rosenzweig 1995). La ecología de comunidades busca conocer y explicar cuales son los patrones de distribución, abundancia y evolución de las especies que interactúan en un ambiente geográfico dado, así como los mecanismos bajo los cuales éstos se rigen (Gianuca et al. 2014; Maurer et al. 2013), y si estos procesos son de origen determinístico o estocástico (García–Quintas and Parada 2014). En ecología de comunidades existen diferentes herramientas que permiten obtener información y realizar análisis sobre los diferentes patrones y mecanismo que influyen en las comunidades. Entre estas herramientas tenemos a los modelos nulos, que han sido de gran utilidad en ecología en las últimas décadas (Gotelli 2000).

Un modelo nulo busca la generación de patrones por medio de la aleatorización de información previamente conocida. Este modelo está diseñado con base en procesos ecológicos o evolutivos de interés para el investigador. La aleatorización de la información permite el desarrollo de nuevos patrones de ensamblaje, simulando la variación estocástica y tomando en cuenta la ausencia de un mecanismo ecológico particular. Los modelos nulos son una gran herramienta que nos permiten explorar y conocer los posibles resultados de acuerdo a los distintos mecanismos ecológicos utilizados (Gotelli 2000). De acuerdo a Gotelli (2000), los modelos nulos presentan diferentes características:

1. Permiten la distinción entre patrones y procesos: Generan simples predicciones de la estructura de la naturaleza y favorecen la comprobación de esas predicciones utilizando datos reales. Por ello es importante distinguir entre los patrones que observamos y los diferentes mecanismos que los producen.

2. Permiten que exista la posibilidad del “no efecto”: Un posible resultado de los modelos nulos es que los patrones observados no pueden ser diferenciados de aquellos generados por el modelo nulo. Si el modelo nulo fue construido adecuadamente podemos deducir que los mecanismos no se encuentran operando y que la teoría no genera predicciones. Sin embargo, si el modelo nulo es rechazado y el patrón es consistente con las predicciones teóricas, nos muestra

evidencia positiva a favor del mecanismo. Evidencias positivas no deben interpretarse de manera definitiva, ya que diferentes mecanismos pueden generar patrones ecológicos similares.

3. Están basados en el principio de parsimonia: Este principio sugiere que se favorezcan las explicaciones simples de las complejas. Sin embargo no existe garantía de que estas explicaciones simples sean las correctas ya que la parsimonia es un principio empírico.

4. Basados en el principio de falsificación: La evidencia negativa nos permite rechazar una hipótesis, pero la evidencia positiva no puede verse como la prueba de una hipótesis. Los modelos nulos son agregados de distintos mecanismos posibles contra una sola hipótesis alternativa.

5. Enfatizan la importancia de los mecanismos estocásticos para producir patrones naturales: Muchos patrones en la naturaleza tienen un componente estocástico que refleja la variabilidad ambiental. Los modelos nulos favorecen la variabilidad natural de la estructura de las comunidades. Algunos factores son tan variables en tiempo y espacio que es mejor representarlos como estocásticos que modelarlos.

### *Teoría de metacomunidades*

El término comunidad se refiere a un conjunto de especies que habitan en un sitio específico (Leibold and Mikkelsen 2002). Sin embargo estas comunidades no actúan como elementos aislados, si no que existe una constante interacción entre ellas por el movimiento de individuos a través de los diferentes sitios (Gregorius, Gillet, and Ziehe 2014). Estas interacciones pueden ser altamente dinámicas y producir cambios en su riqueza y composición cuando son medidas en escalas temporales cortas (Datry, Bonada, and Heino 2016).

A nivel local, existen una gran cantidad de interacciones entre especies y su coexistencia está en función de las dimensiones del nicho y la heterogeneidad del hábitat, así como las diferentes historias de vida. A nivel regional, se ignora las dinámicas locales y se considera que la diversidad es resultado de procesos regionales debido a la dispersión entre comunidades. Cuando la dispersión es

baja, existirán eventos de colonización los cuales regularán el ensamblaje de las comunidades locales. Si la dispersión es alta, ocurren eventos de efecto en masa y de rescate, los cuales modifican la abundancia de especies y sus interacciones, pudiendo afectar la estructura y dinámica de las comunidades a nivel regional. Estos procesos locales y regionales actúan en conjunto para estructurar la diversidad de especies (Leibold et al. 2004).

Al conjunto de comunidades locales, potencialmente unidas por la dispersión de individuos, se le conoce como metacomunidad (Leibold and Mikkelsen 2002). La teoría de metacomunidades constituye un modelo teórico y mecanístico para explicar la interdependencia de las interacciones locales (intraespecie, interespecie, y entre las especies y el hábitat), y los procesos regionales (dispersión) para determinar los patrones espaciales de la distribución y diversidad de especies (Logue et al. 2011; Leibold et al. 2004).

La coexistencia en una metacomunidad está dada por una compensación regional de las habilidades locales competitivas. Como resultado tendremos especies localmente diferentes pero similares a nivel regional. Por lo tanto la diversidad local se encuentra en función del grado de heterogeneidad u homogeneidad regional, y la dispersión entre comunidades (Mouquet and Loreau 2002).

A pesar de que existen diferentes modelos para realizar estas predicciones la teoría de metacomunidades generalmente predice una relación positiva entre la diversidad local de especies (alfa diversidad) y la tasa de dispersión, una mayor dispersión permite que mas especies colonicen los parches (Simonis and Ellis 2014). De igual forma, un incremento en la dispersión lleva a la homogenización en la composición de especies, produciendo una disminución en la beta diversidad (Mouquet and Loreau 2003).

En un contexto dinámico, los cambios ambientales tendrían la capacidad de afectar la distribución local de especies y modificar la estructura de las diferentes comunidades (Fernandes et al. 2014). Si las metacomunidades se estructuran por procesos azarosos, la predicción de los efectos de estos cambios ambientales en la biodiversidad a una escala mayor (continente) no podría ser posible. Realizar este tipo de análisis nos permite conocer y establecer como los patrones

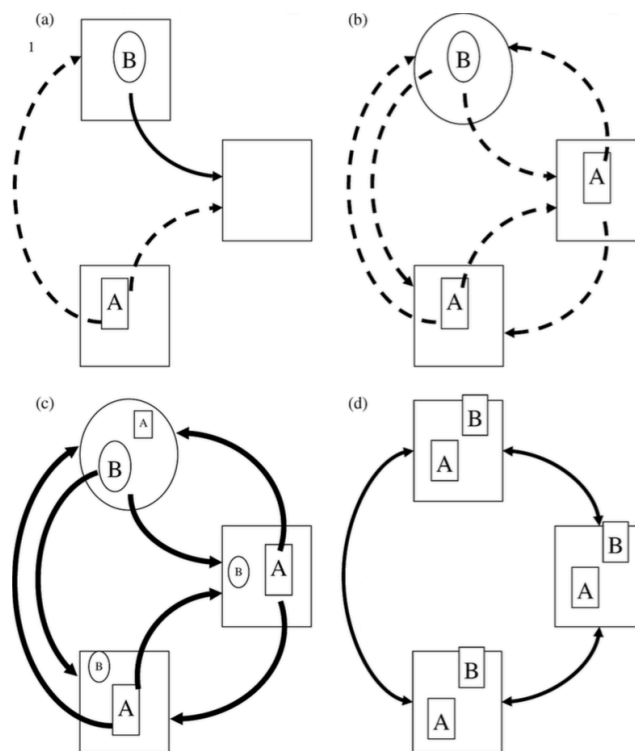
regionales y continentales influyen en la diversidad de especies, así como las dinámicas espaciales y temporales de las metacomunidades (Maurer et al. 2013). Evaluar la importancia de estos procesos y la respuesta a cambios ambientales puede brindarnos información importante sobre la sostenibilidad de una comunidad y poder así desarrollar estrategias adecuadas de conservación.

El estudio de metacomunidades ha identificado dos ramas interrelacionadas y complementarias para comprender las variaciones espaciales en la composición de especies: una enfocada en los mecanismos, y otra en los patrones (Leibold et al. 2004). El enfoque mecanístico busca comprender las variaciones en la composición de sitios a través de la dinámica de parches, el ordenamiento de especies, el efecto de masa y la neutralidad (**Figura 4**) (Presley, Higgins, & Willig 2010). A continuación se describen dichos enfoques y las características que presentan.

- Dinámica de parches: asume que existen múltiples parches que son idénticos con la capacidad de contener a una población. Este modelo está basado en la ocupancia o disponibilidad de los parches. La diversidad local de especies se encuentra limitada por la dispersión, mientras que las dinámicas espaciales se encuentran en función de procesos de colonización y extinción (Holyoak, Leibold and Holt 2005).
- Ordenamiento de especies: este paradigma se centra en que la existencia de diferentes tipos de parches es lo suficientemente diferente para influir en la demografía local y en las interacciones entre especies locales. La calidad de los parches y la dispersión de los individuos afectarán la composición de las comunidades locales (Leibold et al. 2004).
- Efectos de masa: se enfoca en el efecto de la inmigración y emigración en la dinámica de las poblaciones locales. En este sistema las especies pueden ser “salvadas” de la exclusión competitiva de aquellas comunidades en donde son malos competidores a través de la migración hacia comunidades donde sean mejores competidores. El rol que juegan las dinámicas espaciales influye en la densidad de la población local (Leibold et al. 2004).
- Neutral: considera que todas las especies son similares en su competencia,

movimiento y aptitud. Las interacciones poblacionales dependen del movimiento aleatorio de los individuos, lo cual modifica las frecuencias relativas de las especies. La dinámica de diversidad de especies deriva de probabilidades de pérdida de especies (extinción, emigración) y ganancia de especies (inmigración, especiación (Leibold et al. 2004).

**Figura 4. Representación de los cuatro paradigmas de la teoría de metacomunidades para dos especies competentes en dos poblaciones.** Las flechas conectan a ambas poblaciones con sitios para colonización. Las flechas sólidas indican una mayor dispersión que las flechas punteadas, y el movimiento es unidireccional y bidireccional. El grado de competencia de una especie está dado por la caja u óvalo pequeño (nicho) con el símbolo del sitio. Los cuatro paradigmas están ilustrados en a) dinámica de parches; b) ordenamiento de especies; c) efectos de masa; d) neutral. a) muestra condiciones que permiten la coexistencia: un trade-off competencia-colonización ilustrado con la especie A como mejor competidor pero la especie B es un colonizador superior; tercer parche está vacante y puede ser ocupado por cualquier especie. b) las especies están separadas en nichos espaciales y la dispersión no es suficiente para alterar la distribución. En c) las especies se encuentran en hábitats fuente y sumidero; las letras y símbolos pequeños indican poblaciones más pequeñas. En d) todas las especies están presentes en todos los parches; las especies se perderán gradualmente de la región y serán reemplazadas por especiación.



Tomado de: Leibold, MA, Holyoak, M, Mouquet, N, Amarasekare, P, Chase, JM, Hoopes, MF, Holt, RD, Shurin, JB, Law, R, Tilman, D, Loreau, M & Gonzalez, A. (2004). The metacommunity concept: A framework for multi-scale community ecology. *Ecology letters*, 7(7); 601-613.

Debido a la complejidad de los sistemas ecológicos, es poco probable que las especies que interactúan en una metacomunidad se agrupen en uno solo de los paradigmas antes mencionados, sino que las metacomunidades se rigen de acuerdo a múltiples paradigmas. Las suposiciones de los cuatro paradigmas pueden agruparse en dos tipos de acuerdo a Leibold et al. (2004).

- Sobre la naturaleza de los sitios locales: dinámica de parches y paradigma neutral, asumen que los sitios no difieren en ningún aspecto más que en la composición de especies que habitan en estos; por otro lado efecto en masa y ordenamiento de especies asumen que existen diferencias intrínsecas entre los sitios y de acuerdo a sus características, las especies ocuparán diferentes parches.
- Sobre las características ecológicas de las especies involucradas: en la teoría neutral no existen variaciones en las características; en dinámica de parches existe suficiente variación en la habilidad competitiva lo que lleva a una coexistencia regional. En efecto en masa y en ordenamiento de especies, existen dinámicas compensatorias en las habilidades de las especies para desarrollarse adecuadamente bajo diferentes condiciones por lo que la distribución regional de especies será determinado por procesos evolutivos y biogeográficos.

Por el contrario el enfoque basado en patrones evalúa las características en la distribución de especies a través de gradientes ambientales que surgen como resultado de los mecanismos, y se manifiestan en estructuras particulares, aleatorias (*random*), tablero de ajedrez (*checkerboard*), anidado (*nested*), espaciado uniforme (*evenly spaced*), gleasoniana o clemensiana (Leibold and Mikkelsen 2002).

En 1916 Clements describió que las comunidades presentaban diferente composición de especies, pero que esta composición estaba basada en la historia evolutiva compartida y las relaciones ecológicas interdependientes, lo que resulta en grupos de especies con límites de rango coincidentes a lo largo de diferentes porciones del gradiente ambiental.

Por el contrario, Gleason (1926) sugirió una estructura basada en respuestas idiosincráticas específicas e individualistas de las especies en respuesta al ambiente, donde la coexistencia resulta por similitudes en las tolerancias o requerimientos (Presley, Higgins, & Willig 2010). En 1975, Whittaker buscó resolver la disputa entre Clements y Gleason, al desarrollar la idea de “comunidades continuas” contrario a lo que se conocía sobre comunidades “discretas”. Dichas comunidades continuas se refieren a una alternativa azarosa, en donde cada especie se distribuye independientemente de las otras especies, y una fuerte competencia puede resultar en un patrón de tablero de ajedrez, debido a pares de especies mutuamente excluyentes (Leibold and Mikkelsen 2002; Presley, Higgins, & Willig 2010).

Posteriormente Patterson y Atmat (1986) propusieron los patrones anidados, donde sitios con un menor número de especies, son subconjuntos anidados de sitios con una mayor riqueza. En este modelo las probabilidades de extinción de especies consistentemente llevan a patrones de colapso faunístico, debido a que todas las especies tienen las mismas probabilidades de extinción. Esta pérdida de especies está asociada a variaciones en las características específicas de las especies (dispersión, especialización de hábitat, tolerancia a condiciones abióticas) (**Figura 5**) (Leibold and Mikkelsen 2002; Presley, Higgins, & Willig 2010).

**Figura 5.** Descripción de las estructuras de la teoría de metacomunidades de acuerdo a Presley, Higgins, & Willig (2010)

Estructura	Subestructura	Definición	Estructura hipotética
Random		Las especies responden diferentes a los gradientes ambientales.	
No-random	Anidado	El rango de especies que ocupa una porción menor del gradiente ambiental están contenidos dentro de los rangos de aquellas que ocupan una mayor porción	
No anidadas	Tablero de ajedrez	Pares de especies son mutuamente excluyente	
	Clemensiana	Los límites del rango de las especies son altamente coincidentes.	
	Gleasoniana	Distribuciones con recambio y cuyos límites ocurren idiosincráticamente a lo largo del gradiente ambiental	
	Espaciado uniforme	Los límites son hiperdispersos a lo largo del gradiente ambiental, lo que indica diferencias máximas en la tolerancia de especies.	



Como medida para unificar las diferentes suposiciones, Presley, Higgins, y Willig (2010) desarrollaron un modelo para la identificación de por lo menos 12 estructuras basadas en los tres elementos de las metacomunidades (coherencia, recambio de especies, agrupamiento de límites). Dentro del mismo modelo proponen la utilización de seis cuasi-estructuras consistentes con los seis patrones mencionados anteriormente (aleatorias, tablero de ajedrez, anidado, espaciado uniforme, gleasoniana o clemensiana), los cuales presentan características idénticas a excepción de presentar un valor de recambio aleatorio. Cada una de las posibles estructuras asume que la distribución de especies está modelada por interacciones bióticas (competencia, asociaciones de hábitat) o por respuestas a factores abióticos (temperatura, precipitación), que varían entre los sitios que constituyen a un gradiente ambiental.

De acuerdo a la teoría de metacomunidades, diferentes especies tienden a habitar sitios diferentes, y diferentes sitios albergan diferentes especies. A lo largo de los años diferentes modelos de la estructura espacial han sido desarrollados para describir los patrones en la distribución de especies y su respuesta a factores bióticos y abióticos a través de diferentes gradientes ambientales (Henriques-Silva, Lindo, and Peres-Neto 2013).

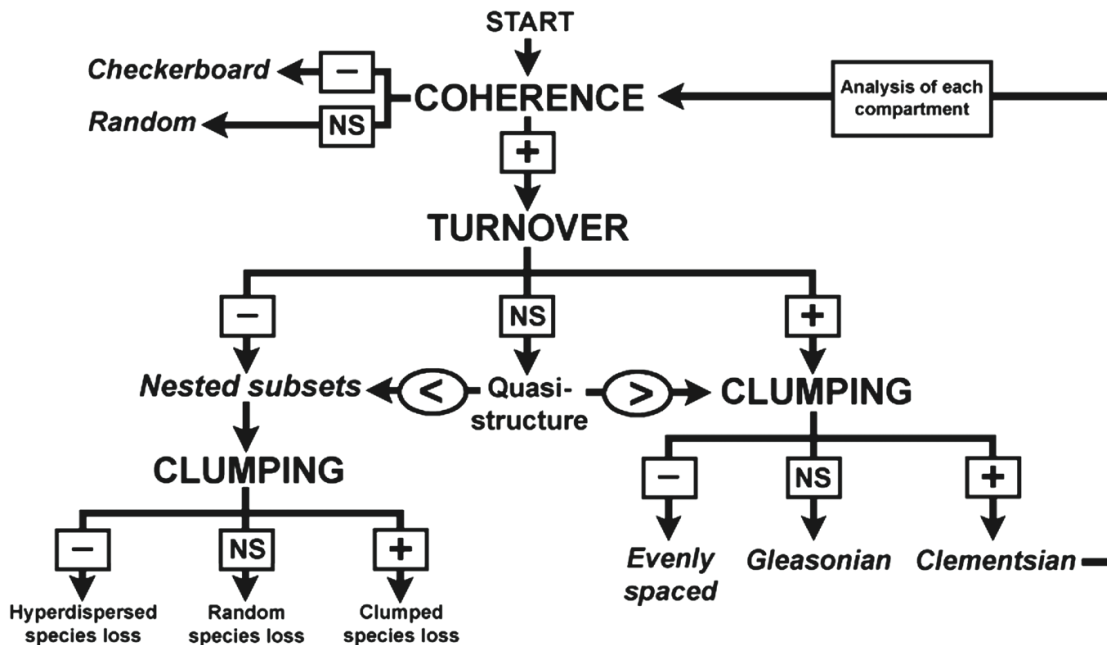
Leibold y Mikkelsen (2002) proponen una metodología para identificar si una matriz se encuentra dentro de alguno de las estructuras mencionadas anteriormente. Para poder determinarlo se requieren conocer tres aspectos esenciales de las metacomunidades, coherencia, recambio de especies y agrupamiento de límites (**Figura 6**).

- **Coherencia (*coherence*):** mide la presencia o ausencia de las especies a lo largo de los diferentes sitios. Si en una secuencia de especies la “presencia” (determinada con un 1) no es interrumpida por la “ausencia” (determinada por un 0) de una especie, entonces la coherencia será positiva. Entre más interrupciones existan, menor coherencia tendrá la metacomunidad (Leibold and Mikkelsen 2002). El número de ausencias es comparada con una distribución nula creada a partir de la aleatorización de la matriz. Si las ausencias observadas no son significativamente diferentes

de las esperadas, las especies no responden al mismo gradiente ambiental y la metacomunidad presentará una estructura aleatoria. Metacomunidades con un mayor número de ausencias observadas (coherencia negativa) presentarán una distribución de tablero de ajedrez, indicando una fuerte competencia entre las especies. Metacomunidades con coherencia positiva tienen menos ausencias observadas que las esperadas y la estructura se evaluará de acuerdo con el recambio y el agrupamiento de límites (Presley, Higgins, & Willig 2010; Henriques-Silva, Lindo, and Peres-Neto 2013).

- **Recambio de especies (*turnover*):** se refiere a la forma en que la composición de especies cambia a lo largo de las comunidades (Henriques-Silva, Lindo, and Peres-Neto 2013). El recambio refleja la tendencia que tienen las especies por reemplazarse unas a otras a lo largo de los diferentes sitios (Leibold and Mikkelsen 2002). Un recambio negativo (bajo), es consistente con distribuciones anidadas, mientras que un recambio positivo (alto) es consistente con estructuras gleasonianas, clemensianas o espaciado uniforme (Presley, Higgins, & Willig 2010).
- **Agrupamiento de límites (*boundary clumping*):** se refiere al grado en que los rangos de los límites de las diferentes especies se agrupan. La significancia del agrupamiento de límites es evaluado con una prueba de chi-cuadrada, que compara la distribución observada con la esperada. En caso de presentar un resultado significativo se utiliza el índice de Morisita para determinar si los límites se encuentran agrupados y presentan respuestas similares a los gradientes. Valores mayores a 1 ( $I > 1$ ) indican una estructura clemensiana, mientras que valores menores a 1 ( $I < 1$ ) indican una distribución de espaciado uniforme, donde las especies compiten a lo largo de gradientes ambientales y buscan compensar su habilidad para utilizar recursos alternativos (Henriques-Silva, Lindo, and Peres-Neto 2013). Las metacomunidades con límites distribuidos aleatoriamente, indican respuestas individuales por parte de cada una de las especies, lo cual es característico de una estructura gleasoniana (Presley, Higgins, & Willig 2010).

**Figura 5.** Diagrama del enfoque jerárquico basado en el análisis de los elementos de la estructura de la metacomunidad y los posibles resultados consistentes con las estructuras idealizadas de Leibold y Mikkelson (2002). Cuenta con tres patrones de pérdida de especies para subconjuntos anidados, seis cuasi-estructuras, y tres estructuras de compartimentos para las distribuciones clemensianas. Los cuadros muestran los resultados estadísticos; los óvalos indican la dirección de recambios no significativos.



Tomado de: Presley, S. J., C. L. Higgins, and M. R. Willig. 2010. A comprehensive framework for the evaluation of metacommunity structure. *Oikos* 119:908-917.

### *Ensamblaje de especies y análisis de co-ocurrencia*

Dentro de las metacomunidades las condiciones bióticas del ambiente y las características de las especies son un elemento clave para la co-ocurrencia de las especies en tiempo y espacio. Este conocimiento nos brinda una herramienta muy útil para comprender la complejidad y sensibilidad de las distintas interacciones en una comunidad y poder así inferir los procesos que las estructuran (Patrick et al. 2014).

Dos especies pueden coexistir en un mismo sitio siempre y cuando no compitan por los mismos recursos, o si su superposición en el uso de recursos es reducido por diferencias ecológicas y/o morfológicas de las especies (Stubbs and Wilson 2004). Así mismo, las comunidades también pueden ensamblarse de acuerdo a filtros ambientales, y a la existencia de ciertas características

adaptativas. Las especies mayormente relacionadas filogenéticamente van a compartir características e historias de vida, por lo que los patrones de composición de especies en una comunidad estarán asociados a la relación evolutiva que exista entre las especies (Krasnov et al. 2013).

En ecología, la teoría neutral de ensamblaje de las comunidades busca conocer la influencia de los procesos de especiación, extinción, dispersión y la deriva ecológica, sobre la abundancia relativa de las especies, bajo el supuesto que todas las especies son demográficamente similares. Esta teoría es de gran utilidad para describir las comunidades ecológicas en diferentes escalas espaciales y temporales; y funciona como un modelo nulo para la construcción de modelos que incorporen las interacciones especie-sitio y compararlos con las predicciones de la información empírica (Volkov, et al. 2003). El objetivo es brindar una base para reconocer patrones no aleatorios provocados por las interacciones de las especies y tener un modelo para evaluar dichas interacciones e identificar las diferentes variables que llevan a asociaciones positivas o negativas entre las especies (Leibold and Mikkelsen 2002).

De acuerdo a Hubbell (2006), la teoría neutral nos permite identificar las conexiones que existen entre los procesos ecológicos que ensamblan a las comunidades en escalas locales, y los procesos evolutivos y biogeográficos que actúan a mayor escala, tales como especiación y filogeografía. La hipótesis de equivalencia ecológica o redundancia funcional, es el pilar principal de la teoría neutral. Es de amplio conocimiento que las diferencias entre las especies favorecen la coexistencia, lo que brinda un efecto estabilizador en la comunidad. El cuestionamiento principal es conocer cuales diferencias son importantes y necesarias para la coexistencia, o incluso identificar si las diferencias entre especies en verdad son esenciales para dichos procesos de coexistencia (Hubbell 2006).

La búsqueda y comprensión de reglas que ensamblan a las comunidades están basadas en la suposición que las interacciones bióticas son lo suficientemente fuertes para producir patrones discernibles. Las reglas de ensamblaje de las comunidades enfatizan la importancia de las interacciones interespecíficas en la

determinación de las especies que estarán presentes en una comunidad en particular. En primera instancia las especies que se sobrelapan en mayor medida en la fenología, uso de recursos y otras dimensiones de nicho no podrán coexistir en el mismo nicho. Por otro lado las especies que coexisten en una misma comunidad deben diferir en ciertas características (como puede ser tamaño corporal o características tróficas) para así poder utilizar diferentes recursos y evitar la competencia entre las especies (Gotelli 2000).

Los patrones de co-ocurrencia de especies en una comunidad son influenciados por las interacciones entre las especies, las condiciones ambientales, o la dispersión de individuos. La co-ocurrencia espacial considera la superposición espacial de especies a lo largo de los diferentes sitios que componen a la comunidad. En este caso cada sitio es representado por un nodo, y los nodos con las mismas especies estarán relacionados (Leibold and Mikkelsen 2002). Por otra parte la co-ocurrencia temporal ocurre dentro de un mismo hábitat y una misma comunidad. Aquí los nodos representan la correlación en la abundancia de especies a lo largo de un periodo de tiempo dentro de un mismo ambiente (Patrick et al. 2014).

La variabilidad ambiental es otro factor que modifica los patrones de co-ocurrencia. Condiciones ambientales asincrónicas (inestables) pueden afectar la sincronía espacial y por consiguiente la co-ocurrencia de especies. Por otro lado, al existir condiciones ambientales sincrónicas (estables) en una comunidad, se permite el establecimiento de interacciones entre las diferentes especies. En comunidad con una menor sincronía ambiental, se formarán redes pequeñas de especies conectadas espacialmente, mientras que al existir condiciones con mayor estabilidad, se formarán redes mayores y más densas de co-ocurrencia de especies (Patrick et al. 2014).

El análisis de la co-ocurrencia de especies se ha utilizado durante mucho tiempo en ecología. En sus inicios, este análisis permitió conocer la importancia de la competencia en la estructura de comunidades ecológicas y de la existencia de reglas de ensamblaje, concluyendo que las especies no ocurren de manera azarosa en la naturaleza, sino que todas responden a variaciones ambientales

(Veech 2013). Estos análisis se realizan a partir de matrices de presencia-ausencia para demostrar la ocurrencia de un grupo de especies en una serie de sitios. En dichas matrices, cada fila representa una especie diferente y cada columna representa un sitio. Utilizando una nomenclatura dicotómica de 0 y 1 se demuestra la presencia o ausencia de las especies (Gotelli 2000).

Existen dos métodos de analizar una matriz de presencia-ausencia. El modelo Q evalúa la similitud de las diferentes columnas, mostrando como los sitios son similares de acuerdo a las especies que contienen. En el modelo R, se comparan las filas de la matriz y muestran la similitud de especies de acuerdo a los sitios que ocupan; los sitios con mayor similitud serán los que compartan especies similares. Ambos modelos son importantes para conocer el ensamblaje de las comunidades (Gotelli 2000).

Las métricas para la aleatorización de presencia-ausencia de especies tienen diferentes fortalezas y debilidades con relación a sus propiedades estadísticas, complejidad computacional y realismo biológico (Veech 2013). Estos métodos difieren en las tasa de error tipo I y error tipo II (Gotelli 2000), donde el error tipo I ocurre cuando un par de especies es erróneamente identificado por tener una asociación positiva o negativa, mientras que el error tipo II ocurre cuando una verdadera asociación positiva o negativa es incorrectamente definida como aleatoria. Estos errores ocurren por el proceso de aleatorización que utilizan los modelos (Veech 2013).

Veech (2013) propone un modelo basado en el uso de la teoría probabilística para demostrar las probabilidades exactas de que dos especies deberán co-ocurrir en mayor o menor frecuencia de la que en realidad lo hacen. Dicho modelo es puramente analítico y no requiere de aleatorización. Este modelo muestra un enfoque de parsimonia para comprender el ordenamiento de las especies. El modelo calcula la probabilidad de que dos especies co-ocurrán en un sitio en específico. Este modelo clasifica a los pares de especies en categorías (asociaciones positivas, negativas o aleatorias), con base en el nivel de significancia. Así mismo, el modelo probabilístico disminuye la probabilidad de obtener errores tipo I y II.

El modelo probabilístico de la co-ocurrencia de especies permite obtener analíticamente (sin aleatorización o simulación) la probabilidad (P) que dos especies co-ocurrán en una frecuencia menor o mayor que la frecuencia de co-ocurrencia observada. Estas probabilidades pueden obtenerse analíticamente bajo el supuesto que la probabilidad de ocurrencia de las especies en cada sitio es igual a la frecuencia observada entre todos los sitios (Veech 2013). Este tipo de análisis nos permite estudiar y predecir futuras tendencias de co-ocurrencia, conocer los procesos de ensamblaje de las comunidades, las interacciones entre especies, y determinar patrones de distribución para los diferentes pares de especies (Veech 2013; Patrick et al. 2014).

## **Capítulo 2. Metacomunidad y co-ocurrencia análisis de influenza A virus in birds**



Metacommunity and co-occurrence analysis of influenza A virus in birds.

Daniel Mendizabal-Castillo<sup>1</sup>, Gerardo Suzán<sup>1</sup>, Iván Castro-Arellano<sup>2</sup>, Joseph A. Veech<sup>2</sup>, Oscar Rico-Chavez<sup>1\*</sup>

1 Laboratorio de Ecología de Enfermedades y Una Salud, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510, México

2 Department of Biology, Texas State University, San Marcos, TX 78666, USA

\*corresponding author: [orichvet@gmail.com](mailto:orichvet@gmail.com)

## *Abstract*

In the last years, the study of pathogen communities has been of big concern for understanding pathogen-host dynamics and the epidemiological and ecological factors related to it. Influenza A virus (AIV) is an important pathogen in public health and the poultry industry, however we still need to understand the ecological patterns that act at bigger geographical scales (continent or biogeographic region). In this study we assess how AIV metacommunities are structured, as well as how subtypes co-occurred in different bird species at global and regional scales. Using Influenza Research Database we obtained 188,412 records of 241 bird species, grouped in 11 zoogeographic regions. In the co-occurrence analysis, positive associations were found between pairs of AIV subtypes, some of them of zoonotic importance; and for metacommunities, in the palearctic, oriental and sino-japanese regions, as well as worldwide, quasi-clumped species loss nested structures were presented. Positive co-occurrence associations indicate that different influenza subtypes are presented in the same bird species, which can favor a process of coinfection that may lead to genetic reassortment and the generation of new genotypes, some of them with zoonotic potential. However, in the metacommunity framework, nested structures are associated with a sample bias, mainly due to an over sampling of *Anas platyrhynchos* and *Gallus gallus domesticus*. It is important to modify how surveillance is carried out to ensure a greater overview of the ecological factors involving AIV, and develop better surveillance and monitoring programs.

Keywords: birds, co-occurrence, Influenza, metacommunity ecology, multi-host pathogen

## *Introduction*

One of the main issues in ecology is to understand the factors involved in the structure of biological communities through time and space (Rosenzweig 1995). Community ecology studies distribution patterns, abundance and evolution of species that interact in a specific geographic environment, as well as the mechanisms involved in the community arrangement (Gianuca et al. 2014; Maurer et al. 2013), and determine if these processes are deterministic or stochastic (García-Quintas and Parada 2014). However, in the last decades, ecological communities have been affected by anthropogenic activities. Habitat loss and fragmentation have altered biodiversity and affected ecosystem function and community dynamics, including those of pathogens (Dirzo et al. 2014; Suzan et al. 2015). Some of these alterations are an increase in pathogen distribution and the risk of emergence of new pathogens, as well as changes in dispersion and transmission of diseases (Suzan et al. 2015; Foley et al. 2005). Understanding host-pathogen dynamics, and their epidemiological and clinical patterns, can give us important insights in the community ecology of pathogens (Mihaljevic 2012).

Influenza virus is an important pathogen due to the economic impact it represents every year, its pandemic potential and the capacity to infect multiple hosts (WHO, 2013). The influenza virus belongs to the Orthomyxoviridae family, has a pleomorphic structure with eight segments of ss-RNA, that encode ten proteins. It is classified in four influenza virus genus, A, B, C, and D (Su et al. 2017), that differentiate each other by their antigenic variations in the matrix protein (M1) and nucleoprotein (NP) (García-García and Ramos 2006).

Influenza A virus, also called Avian Influenza Virus (AIV) presents different subtypes that depend on their hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) combinations. At least 120 different subtypes have been reported in wild birds (Olsen et al. 2006). Most of them are low pathogenic influenza virus (LPIV) with a mild disease involving the respiratory and digestive tract. However some high pathogenic influenza virus (HPIV) subtypes, mainly H5 and H7, produce a systemic disease with mortality of nearly 100% (García-García and Ramos 2006).

AIV is distributed worldwide and has been isolated from different species such as

humans, pigs, ferrets, cats, marine mammals and several wild birds (Olsen et al. 2006). AIV has been detected in at least 105 bird species from 26 different families, but it has been isolated most frequently in Anseriformes and Charadriiformes (García-García and Ramos 2006). These two orders are considered the main reservoirs of AIV, in relation to their feeding and reproductive behavior, worldwide distribution and the characteristics of the environment where they live (Reperant, Kuiken, and Osterhaus 2012). Due to the factors mentioned above, recent studies have focused on understanding the evolution (Shao et al. 2017), pathology (Horman et al. 2018), and epidemiology (Goneau et al. 2018) of AIV. However, only few studies have focused on understanding the macro ecology of AIV and the mechanisms and patterns that influence their communities.

One of the tools that has been used for these ecological purposes is null modeling (Gotelli 2000). These tools help us build models for species-site interactions and then compare them to predictions about the empiric information. This way we can identify non-random patterns for species-sites interactions and the possible factors related to them (Leibold and Mikkelsen 2002).

Within null models, metacommunity theory constitutes a theoretical and mechanistic model for explaining the relation that exists between local communities. A metacommunity can be defined as a group of communities in an specific geographical area that are connected by the movement of species between communities (Leibold and Mikkelsen 2002). Metacommunity theory aims to study how species interactions (intra and interspecies, as well as with the environment) and regional processes (dispersion) affect species distribution and diversity within an specific geographical area (Logue et al. 2011, Leibold et al. 2004). Throughout the years different models have been made to identify the spatial structure that metacommunities have in relation with species distribution and their response to biotic and abiotic factors, through different environmental gradients. In this framework habitat availability, local environmental conditions and spacial connectivity, control the structure of metacommunities through time and space (Datry, Bonada, and Heino 2016).

Regional processes operates at larger scales and regulate species introduction to

local communities (dispersion and connectivity), while at local scales populations are selected by environmental filters (nestedness and food availability), stochastic processes (colonization and extinction) and biotic interactions (Stegen et al. 2013). In this context, environmental changes can affect local distribution of species and therefore impact the metacommunity structure (Fernandes et al. 2014).

Metacommunity theory in pathogen ecology is a very useful framework for understanding the driving patterns of species distribution that can shape reservoir, vector, and infectious diseases occurrences (Suzan et al. 2015). It can give us important insights for understanding the spatial ecological dynamics of pathogens, the processes that structure those communities, and pathogen evolution (Mihaljevich 2012). The metacommunity represents an integrative framework for understanding disease ecology.

Within metacommunities, co-occurrence analysis is an important tool that allows us to understand the processes that influence communities assemblage, the nature of species interactions (positive, negative or random) and the distribution patterns for the different pairs of species (Veech 2013; Patrick et al. 2004). Co-occurrence analysis aims to define how pairs of species interact between each other within a geographical area and the ecological processes that favor these positives (or negative) interactions (Patrick et al.2014). This tool allow us to determine if pairs of species occur randomly in nature or if their interactions are influenced by certain ecological assemblage rules. Due to the above, metacommunity theory and co-occurrence analysis are important tools in the study of how AIV behaves at local and regional scales and host-pathogen dynamics (Maurer at al. 2013).

Within this paper we want to address two main hypothesis: AIV metacommunities structures are influenced by ecological patterns of bird species rather than by deterministic processes; and AIV co-occurrence is associated with ecological and evolutionary aspects of the virus rather than a random co-occurrence of subtypes. Understanding the macro ecology of this virus can give us important insights on its evolution, pathogeny and epidemiology in a constant changing world.

## Material and methods

### Viral data

From the Influenza Research Database (NCBI) we selected all the records of Influenza A virus that had been identified in bird species from all around the world. For the purpose of this research we selected just the records of the subtypes that had been sequenced. The database consisted of sample ID, subtype, country, date, strain, and GenBank access number. Using the free software OpenRefine (Google Refine 2016) we extracted from the strain name (e.g. (A/greater white-fronted goose/California/44358-095/2007(H6N1)) the host name (e.g. greater white-fronted goose) and the locality (e.g. California), and added it to the database. We obtained the host's family, genus and species using the taxonomy information for each species, available in the IUCN Red List of threatened species. With the package “ggmap” (Kahle and Wickham 2013) from the R free software (R Core Team 2016) we obtained the coordinates for every locality where the virus had been identified. Using the global map of zoogeographic regions by Holt et al. (2013) we identified the zoogeographic region (Nearctic, Panamanian, Neotropical, Palearctic, Afrotropical, Saharo-arabian, Sino-Japanese, Oriental, and Australasian) where the sample was taken (*Figure 1*). The complete database consisted of ID, GenBank access number, subtype, country, locality, latitude and longitude, date, host family, host genre, host species common name, host species scientific name, and zoogeographic region.



**Figure 1.** Map of the terrestrial zoogeographic realms and regions of the world. (Holt et al., 2013)

## **Metacommunity analysis by zoogeographical regions**

The first step for the metacommunity analysis was to create a presence-absence matrix for species (AIV subtypes) found in each site (bird species). In this study, the local community consists of all the influenza subtypes that inhabit a single bird species. Using the records of AIV detected in the different birds we created 7 different presence-absence matrices (“species” in columns and “sites” in rows), one for each zoogeographic region. As well we analyzed a worldwide matrix that included every single record of AIV ever detected in birds from around the world.

Using the “metacom” package (Dallas 2014) in R we analyzed the elements of metacommunity structure (coherence, boundary clumping and turnover) according to the framework of Leibold & Mikkelsen (2002), and Presley, Higgins and Willig (2010), for distinguishing among patterns of metacommunity structure. This package is based on the evaluation of the three metrics calculated from a presence-absence matrix (Dallas 2014). The matrix was first ordinated via reciprocal averaging, where species with similar ranges and sites with similar species were grouped together to minimize embedded absences. The matrix was compared to the null distribution of random matrices. It’s important to notice that boundary clumping and turnover are only relevant if the matrix has a positive coherence (empirical matrix has fewer embedded absences than null matrices) (Dallas 2014).

According to the results of the metacommunity analysis we made a general lineal model (GLM) for specific regions to identify the relationship between the number of cases per bird species (independent variable) and the number of influenza subtypes (dependent variable). This way we were able to detect if sampling efforts influenced the diversity of subtypes found in birds and if any bias existed on the bird species that were sampled.

## **Co-occurrence analysis patterns between influenza subtypes**

Species co-occurrence analysis was done using the same species-site presence-absence matrices as for the metacommunity analysis, but with species

as rows and sites as columns. Matrices were created for each zoogeographic region and for the entire world. We used a species co-occurrence probabilistic model developed by Veech (2013). The “cooccur” package in R, applied a probabilistic model for species co-occurrence to a set of species (AIV subtypes) that are distributed among a set of sampling sites (bird species). The algorithm calculated the observed and expected frequencies of co-occurrence between pairs of species. The expected frequency was based on the distribution of each species being random and independent of all other species in the assemblage. The analysis evaluates the probability that a more extreme (low or high) value of co-occurrence could have been obtained rather than the probability obtained by chance. The model then classified species pairs as having positive, negative or random associations (based on the expected frequencies) as well as the effect size for each pair of subtypes, a quantitative measure for co-occurrence.

Afterwards, for each pair of subtypes that co-occur we identified those that were zoonotic and those that were non-zoonotic in each zoogeographic region and worldwide. This information was obtained from Widdowson (2017), for all the confirmed reports of zoonotic Influenza A virus infections in humans (H1N1, H3N2, H5N1, H5N6, H6N1, H7N2, H7N3, H7N7, H7N9, H9N2, H10N7, H10N8). By taking into account the effect size (quantitative measurement of co-occurrence) for each pair we performed an ANOVA in R to identify if the effect size mean for the three pair groups (pairs of zoonotic subtypes that co-occur positively, pairs of zoonotic and non-zoonotic that co-occur positively, and pairs of non-zoonotic subtypes that co-occur positively) presented any significant differences ( $p < 0.05$ ). We used the effect size to make this comparison, because it is a quantitative measure of the associations between pairs. Finally we ran a Turkey HSD test using R to confirm where the differences occurred between groups.



## *Results*

### **Data overview**

Our final database consisted in a total of 188,412 records of influenza A virus that had been identified in bird species from all around the world. The data corresponds to all the records that had been identified since 1902 to 2016, from a total of 96 countries, from every continent except Antarctica. All records obtained belonged to a sample of 241 bird species, of 132 genres and 46 families. There were 127 influenza subtypes, that corresponded to HA1 to HA16 and NA1 to NA9. Of the 188,412 records, 75,138 (39.88%) belonged to *Anas platyrhynchos* and 46,734 (24.8%) to *Gallus gallus domesticus*. The most representative subtypes were H5N1 with 29,395 (15.6%) samples, followed by H4N6 with 15,195 (8.06%), and H3N8 with 14,084 (7.47%).

### **Metacommunity analysis**

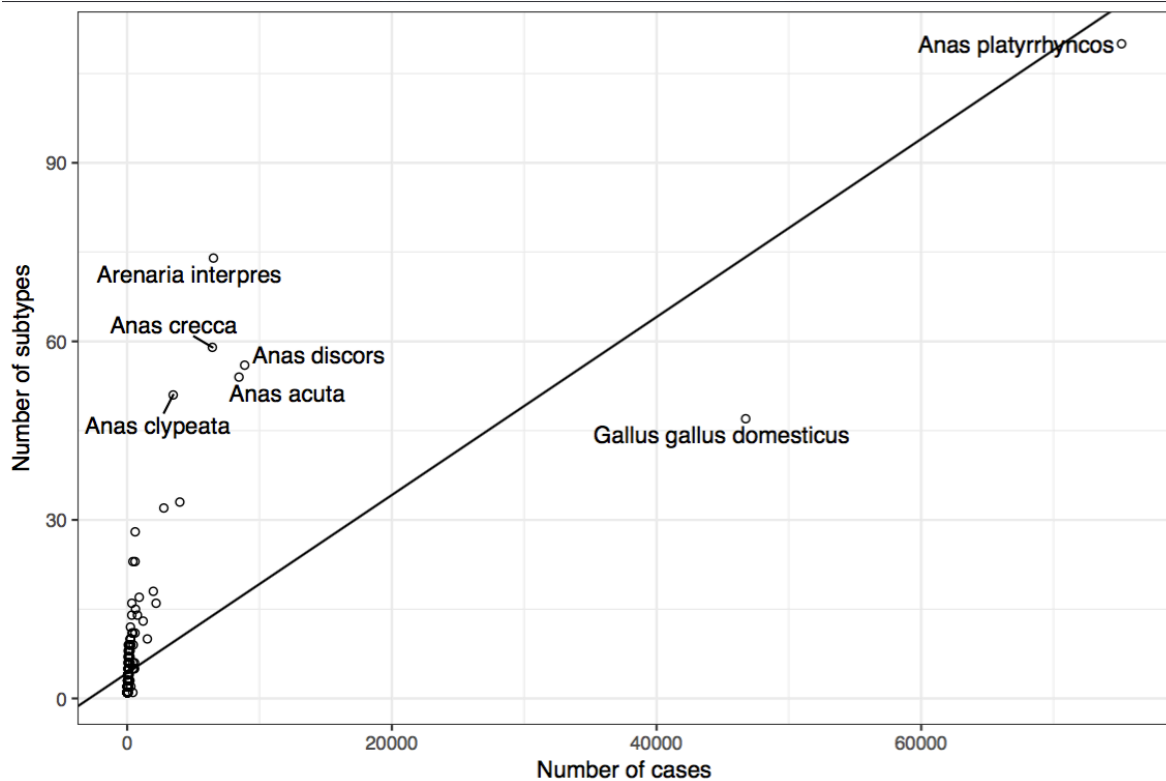
In the Palearctic and Sino-japanese regions, and worldwide, the metacommunity analysis resulted in a positive coherence, non-significant negative turnover, and positive boundary clumping, which according to Presley, Higgins, & Willig (2010), defined a quasi-nested structure with clumped species loss. For the Oriental region positive coherence, significant negative turnover and positive boundary clumping was obtained, resulting in a nested structure with clumped species loss. All other regions had a random metacommunity structure due to a non-significant coherence. The Panamanian region had insufficient data and was not analyzed (*Table 1*).

**Table 1.** Metacommunity structures of AIV subtypes in the different bird species, for each zoogeographic region according to values of coherence, turnover and boundary clumping.

ZOOGEOGRAPHIC REGION	COHERENCE			TURNOVER			BOUNDARY CLUMPING		METACOMMUNITY STRUCTURE
	embAbs	pval	simulate dMean	turnover	pval	simulate dMean	index	P	
<i>Neartic</i>	4116	<b>0.165</b>	4549.32	425376	0.87	452619.55	16.12	<b>0</b>	<b>Random</b>
<i>Neotropical</i>	44	<b>0.244</b>	63.024	1354	0.208	1834.758	1.560976	0.004	<b>Random</b>
<i>Panamanian</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Palaearctic</i>	<b>2952</b>	<b>0.026</b>	<b>3663.47</b>	<b>41969</b>	<b>0.091</b>	<b>383722.3</b>	<b>15.715</b>	<b>0</b>	<b>Quasi-nested clumped species loss</b>
<i>Saharo-arabian</i>	37	<b>0.475</b>	44.376	509	0.557	625.586	3.442	0	<b>Random</b>
<i>Afrotropical</i>	0.577	<b>0.577</b>	26.989	314	0.442	406.39	6.280	0	<b>Random</b>
<i>Oriental</i>	<b>346</b>	0.001	<b>916.399</b>	<b>5128</b>	<b>0.010</b>	<b>96550.86</b>	<b>39.65</b>	<b>0</b>	<b>Nested clumped species loss</b>
<i>Sino-japanese</i>	<b>362</b>	<b>0.007</b>	<b>727.197</b>	<b>5205</b>	<b>0.121</b>	<b>34828.94</b>	<b>12.952</b>	<b>0</b>	<b>Quasi-nested clumped species loss</b>
<i>Australian</i>	46	<b>0.192</b>	75.531	978	0.915	1008.46	3.348	2.0E-07	<b>Random</b>
<i>Worldwide</i>	<b>10626</b>	0.0002	<b>15486.77</b>	<b>732074</b>	<b>0.0709</b>	<b>5011011.48</b>	<b>25.705</b>	<b>0</b>	<b>Quasi-nested clumped species loss</b>

The general lineal model (Figure 2) showed that two bird species (*Gallus gallus domesticus* and *Anas platyrhynchos*) were the ones that had more AIV subtypes recorded. For the majority of the bird species (99.17%) there were fewer records and therefore the influenza subtypes identified in these species were less than from the other two species. Other bird species with more than 41 AIV subtypes found in them were *Arenaria interpres*, *Anas crecca*, *A. discors*, *A. acuta* and *A. clipeata*.

**Figure 2.** General lineal model that shows the relationships between influenza A virus subtypes diversity and the sampling effort for each bird species. Each dot represent a bird species. Species that had more that 46 subtypes were the ones that where identified with a name.



### Co-occurrence analysis:

With the co-occurrence analysis we were able to detect if pairs of AIV subtypes were frequently found together (positive co-occurrence) or seem to exclude each other (negative co-occurrence). More than 83% of pairs were eliminated during the analysis because of an apparent non co-occurrence between subtypes. However, the remaining pairs of subtypes, except one in worldwide (H3N8 + H5N1), presented positive co-occurrences in bird species (*Table 2*). Worldwide and in the Nearctic region a bigger number of pairs were analyzed. In the Saharo-arabian, Afrotropical and Australasia region we obtained mostly random co-occurrences.

**Table 2.** Influenza subtypes pairs co-occurrence by zoogeographic region and worldwide. The table show the number of positive, negative and random co-occurrence patterns between the diferente AIV subtypes

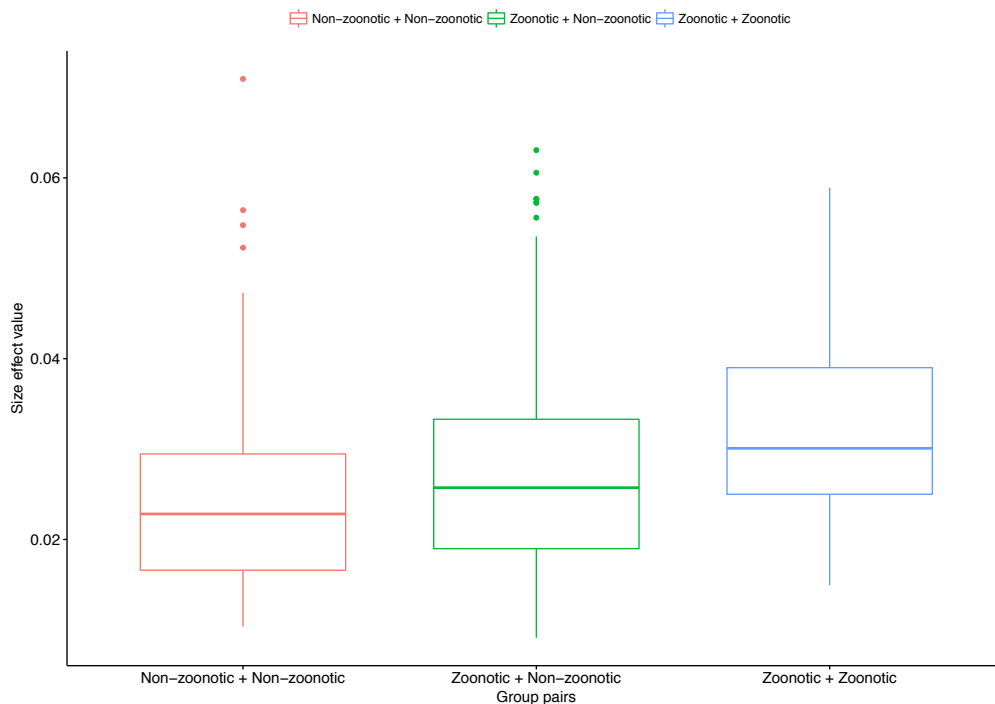
Region	Total number of pairs	Pairs eliminated	Remaining number of pairs	Pairs with positive co-occurrence	Pairs with negative co-occurrence	Pairs with random co-occurrence
<b>Worldwide</b>	8001	89.3%	806	643	1	162
<b>Nearctic</b>	6670	83.49%	1101	836	0	265
<b>Panamanian</b>	231	96.1%	5	0	0	5
<b>Neotropical</b>	4753	95.41%	218	78	0	140
<b>Palaearctic</b>	4753	95.41%	218	78	0	140
<b>Saharo-arabian</b>	78	89.74%	8	0	0	8
<b>Afrotropical</b>	171	98.83%	1	0	0	1
<b>Oriental</b>	2278	98.6%	32	1	0	31
<b>Sino-japanese</b>	2701	98.41%	43	3	0	40
	630	99.68%	2	0	0	2

The subtypes that co-occur more commonly were:

- Worldwide: H3N8, H4N6, H9N2, H5N2 and H1N1
- Nearctic: H7N3, H6N1, H10N7, H4N6 and H11N9
- Neotropical: H4N6, H7N7, H5N8, H6N8 and H1N1
- Palaearctic: H4N6, H7N7, H5N8, H6N8 and H1N1

The ANOVA test for the three positive pair groups resulted in a significant p-value (0.000000393). The Tukey HSD test showed that there are significant differences ( $p < 0.05$ ) between all the groups. The zoonotic pairs group presented bigger effect sizes than the other two groups, which suggested that worldwide the zoonotic influenza viruses are co-occurring positively in a more stronger way than the non-zoonotic subtypes (Figure 3).

**Figure 3.** ANOVA test of the co-occurrence effect size mean for the three pair groups (Non zoonotic pairs; Zoonotic and Non-zoonotic pair; Zoonotic pairs) of influenza subtypes that co-occur positively worldwide.



The Nearctic region showed a significant p-value (0.00000278) for the ANOVA, demonstrating a difference between the effect size mean of the three groups (Figure 4). The Tukey HSD test showed that the mean effect sizes of the zoonotic pairs was bigger than the mean effect size of the zoonotic, non-zoonotic group ( $p = 0.0000156$ ), and the non zoonotic group ( $p = 0.0000015$ ). There were no significant difference between the zoonotic, non-zoonotic group and the non-

zoonotics ( $p = 0.6385602$ ). As well as the results from worldwide, in the Nearctic region zoonotic pairs co-occurred at a larger percentage. The ANOVA test p-value for the Palearctic and Neotropical regions was non-significant. In these two regions pair groups was non-significant ( $p = 0.536$  and  $p = 0.777$ , respectively) showing no differences in the mean effect size of the three groups.

## *Discussion*

### **Metacommunity analysis**

Metacommunity structures in the Palearctic, Oriental and Sino-japanese regions, as well as worldwide, showed nested and quasi-nested structures. In nested structures, species that occupied a smaller portion of the environmental gradient are contained within the ranges of those that occupy a larger portion of the gradient (Almeida-Neto et al. 2008). For this study nested metacommunity structure indicates that in certain bird species a bigger richness of influenza subtypes (> 46 subtypes) have been identified. In contrast other species (97% of bird species) have fewer subtypes (< 46 subtypes) and act as subsets of the species with a bigger richness. The different environmental gradients for the metacommunity structure then are considered to be genetic and functional differences between bird species.

Few studies have considered pathogens in a metacommunity analysis. Álvarez-Mendizabal et al. (2018) found that flavivirus in rodents and birds in Bahia de Kino, México, presented Clementsian structures due to heterogeneous habitats in which some species are clustered. Nieto-Rabiela et al. (2018), analyze viral metacommunities in rodents across different zoogeographical regions and found quasi-Clementsian, Clementsian and random structures. Quasi-Clementsian and Clementsian structures were identified due to a response to environmental filters across regions, arguing that viral distribution responds to dispersion filters and host characteristics. Random structures were obtained due to information biases and dynamism in ecosystems. These structures are not consistent with the results we obtained in our analysis. Nestedness structures of AIV are associated with a

bias in the sampling of the virus, there exists a positive correlation between sampling effort and AIV subtypes richness.

Anseriformes and Charadriiformes are considered to be the main reservoirs of AIV (García-García and Ramos 2006). In our analysis, only seven of the 241 species recorded had more than 46 different AIV subtypes. Of those seven, five belonged to Anseriformes order and one belonged to Charadriiformes order. These species present a worldwide distribution, which is related to migratory patterns that connect many bird populations in time and space, and therefore these species can act as important reservoirs for dissemination and transmission of the different AIV subtypes (Olsen et al. 2006). However in our study we analyze 88 species of Anseriformes, and 57 species of Charadriiformes, and only seven of them host a considerable amount of AIV subtypes. It would be important to monitor other species, for understanding more completely the distribution and ecology of AIV.

One of the most sampled species was *Gallus gallus domesticus*. This is due to its economical and productive importance that makes it a target species for surveillance programs. AIV is a huge threat for the poultry industry because of the high mortality rates that this virus causes in these populations. It is assumed that wild birds transmit AIV to poultry, and due to multifactorial processes (Diederich et al. 2015) it can change from LPAIV to HPAIV. However, the role of *G. gallus domesticus* in the epidemiology of influenza is not completely understood. The abundant richness of subtypes that had been found in this species can give us important insights on how surveillance programs are being made, and even change the paradigm on the transmission of this pathogen between populations.

Most studies worldwide focused on the study of *Anas platyrhynchos* and the influenza subtypes it carries. It has been shown that *A. platyrhynchos* can act as an important mixing vessel for the recombination of influenza subtypes (Sharp et al. 1997). Its behavior, worldwide distribution and ecology has made this species to be considered the main reservoir of the influenza virus. Because of the latter, this duck may be demonized and we do not know with enough certainty if this assumption is true.

Hoye et al. (2010), reviewed 191 reports of surveillance of wild bird from 1961 to

2007 and showed there exists a considerable bias toward Anseriformes and Charadriiformes, as well as species that can be easily caught or that are present at higher concentrations (e.g. *A. platyrhynchos*). This sampling bias is mostly related to the sampling methods (ornithologist-captured and hunter-collected birds) used in wildlife disease surveillance. Surveillance programs then do not provide a clear representation of the diversity of wild birds and their relative abundances, so we may be overlooking potential reservoirs or host species.

The evolution and transmission of AIV is closely tied to the host's ecology and environmental characteristics (Spackman 2009). However if we continue studying the same species over and over again we will not be able to understand the interactions that exists between the different birds species and their AIV subtypes. For example, in the last years, more studies have focused on terrestrial birds (mainly passerines), rather than water birds. Terrestrial poultry such as quails or turkeys have been proposed to be AIV amplifiers and the main connector between wild waterfowl and domestic poultry (Capua and Munoz 2013). However the epidemiological role of these birds is still unclear.

As mentioned above, wild birds may act as reservoirs for the IAV, however, in the last years clinical and sometimes lethal diseases have been widely reported in wild birds. In 2002, an H5N1 outbreaks caused the deaths of waterfowls and other bird species (*Phoenicopterus ruber*, *Egretta garzetta* and *Ardea cinerea*) in Hong Kong (Trevor et al. 2002). In 2016 a H5N8 started circulating in Europe, causing in the Netherland the death of over 13,600 wild birds, most of them being *Aythya fuligula* and *Anas penelope* (Kleyheeg et al. 2017). The identification of disease caused by HPAIV in wild birds is of big concern for the conservation of species and it changes the idea about wild birds being considered as reservoirs of the virus. The virus is starting to affect wild birds and this could lead to a huge environmental problem.

Different cases of influenza affecting wild birds can be related to the way humans have altered the ecology of AIV. Even though the impact of our actions hasn't been completely proven, the role of wildlife trade and the release of exotic species can play an important role in the dissemination of new influenza subtypes in new geographical areas, where native species don't have an immune protection



(Stallknecht et al. 2006). Other anthropogenic effects such as climate change and urban development can alter migration patterns and population dynamics (Reed et al. 2003). This hasn't been studied with a closer look, but a change in the ecology of this virus is a fact, and this is having important consequences in the conservation and maintenance of wild bird populations.

### **Co-occurrence analysis**

AIV presents a high divergence between subtypes and little internal genetic diversity within subtypes (Dugan et al. 2008). Yet, one study has shown coinfections between different subtypes in the same hosts (Sharp et al. 1997), and even coinfections between genotypes of the same AIV subtype (Qi et al. 2018). By using the co-occurrence analysis, we found out that in the Nearctic, Palearctic and Neotropical regions as well as worldwide, almost all AIV subtypes pairs co-occur positively in the same bird species. These co-occurrences mean that different pairs of subtypes of influenza have been found in the same bird species. These positive interactions can help us infer if there exists little or a lack of possible competition between subtypes coinfecting the same hosts. Our data does not represent a coinfection within the same individuals, however it do demonstrate that different subtypes have been found in the same bird species.

Lu, Lycett, and Leigh Brown (2014), demonstrated that certain subtypes, such as H1N1, H3N8 and H4N6, were constantly found in wildbirds, mainly ducks. In our study we detected that also those three subtypes presented positive co-occurrence with most of the subtypes analyzed. As well, H5N2, H5N8, H7N3 and H7N7, co-occur constantly with many subtypes. This information is of great concern because H5 and H7 are considered to be HPIV and have a zoonotic importance. The fact that these subtypes are constantly co-occurring with other subtypes in the same bird species can result in a possible genetic reassortment and the development of new influenza strains, that can be of importance for the poultry industry and in public health.

In our results we also detected that zoonotic pairs have a higher size effect than non-zoonotic pairs or even the combination between zoonotic and non-zoonotic

pairs. Therefore, we can assume that some pairs of subtypes have been found more commonly in certain bird species in comparison to other subtypes. And from these subtypes the ones that co-occur in a stronger way were those that have been considered zoonotic. But what are the implications of these co-occurrence patterns?

It is well-known that each subtype possesses a different probability of giving or accepting viral genes of other subtypes (Lu, Lycett, and Leigh Brown 2014), however the dynamics of these subtypes have depend on a combination of epidemiology and cross-reactive immunity based on antigenic distances (Shao et al. 2017). The higher co-occurrence of zoonotic subtype pairs in wild birds may be a possible indication of how these subtypes, due to a possible “*cooperative behavior*”, are more capable of avoiding a host’s immune response and allowing replication and transmission to new hosts. The effect of these zoonotic subtypes co-occurring more often with other subtypes could be related to an increase in virulence and the possibility of affecting multiple bird species; or the transmission to new host species, including humans (Lu, Lycett, and Leigh Brown 2014; Capua and Munoz 2013).

However there’s also the possibility that the interaction between two subtypes in a coinfection process can attenuate pathogenicity of one of the subtypes. In a study by Diederich et al. (2015), HPAI H7N1 was attenuated after reassortment with influenza A virus from other species (equine, swine and human). This reassortment can produce a highly pathogenic subtype, or by the contrary can produce a mild pathogenic subtype.

These findings can give us important recommendations during surveillance campaigns for identifying the potential products of zoonotic subtypes pre-reassortment during a coinfection. Or it could be a biological way in which we could attenuate the pathogenicity of a subtype that is of concern during an outbreak. And even though the origin of new subtypes depends on a complex network of genes, geography and ecology, as well as species immunity and fitness (Sharp et al. 1997; Dugan et al. 2008), it could be possible that certain subtypes that tend to co-occur more commonly with zoonotic viruses have the potential to generate novel

re-assortments capable of transmitting to new hosts, by facilitating certain interconnected mutations or relations. Understanding viral diversity in AIV can help us infer the processes that affect virulence, pathogenicity and host dynamics, and maybe, it can be a way in which we can control outbreaks in poultry and in humans populations.

## *Conclusion*

In this research project we were able to identify an important bias on the available information of AIV. This bias didn't allow us to identify the precise metacommunity structures of the different zoogeographical scales, so we couldn't accept this hypothesis. However we did find an importance co-occurrence pattern between AIV subtypes that are zoonotic, which is related to our hypothesis about co-occurrence patterns related to ecological factors. This information is of big importance because it opens the path for further research about how subtypes are interacting between each other, and the possible mechanisms that can be associated with zoonotic subtypes. It can give important insights about how subtypes can become zoonotic and therefore develop more concrete surveillance programs.

The use of the elements of metacommunity structure framework and co-occurrence analysis can give us important insights on the ecology, evolutionary and biogeography of pathogen-host systems. Many studies focus on understanding the dynamics that occur between hosts and their pathogens, however we have to understand that these relationships have different factors that influence their presence or absence. We have to understand that in ecology everything act as a system and there are many factors involved in these dynamics. Even though the influenza virus is an extensively investigated virus, we haven't completely understood the processes and dynamics related to it. Surveillance and monitoring programs have to be more adequate and precise. And bigger efforts have to be made to understand the relation that exist between this pathogen and other environmental actors. Also this programs have to start focusing on the conservation of species and their habitat, because as we have seen influenza virus

is starting to affect bird species.

There's still plenty of information we have to get. However studying systems as a whole can give us important clues on the multiple associations that occur between beings and their environment. Studying pathogens at bigger scales (continental, regional and worldwide) can help us understand better the way beings are interacting and the factors involve in it. These tools allow us to manage communities in a more sustainable way, and therefor help us identify possible events that could affect environmental health and consequently human health.

#### Acknowledgements

We acknowledge Posgrado en Ciencias de la Producción y Salud Animal, UNAM, and CONACYT MSc grant for DMC.

#### Authors' contributions

Manuscript design and data analysis DMC, ORC, IVC, JAV. Manuscript writing DMC, ORC, IVC. Data collection DMC.

#### Supplementary information

Data supporting analysis was uploaded as supplementary material (SM1).

#### Competing interests

Authors have no competing interests

## References

1. Rosenzweig, M.L. (1995). *Species Diversity in Space and Time*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
2. Gianuca, A. T., Dias, R. A., Debastiani, V. J. and Duarte, L. D. S. (2014), Habitat filtering influences the phylogenetic structure of avian communities across a coastal gradient in southern Brazil. *Austral Ecology*, 39: 29–38. doi:10.1111/aec.12042
3. Maurer, BA, Kembel SW, Rominger, AJ and. McGill BJ. (2013). Estimating metacommunity extent using data on species abundances, environmental variation, and phylogenetic relationships across geographic space. *Ecological Informatics*. 13:114–122
4. García–Quintas A & Parada Isada A. (2014). Effects of migrations on the nestedness structure of bird assemblages in cays of the Jardines de la Reina archipelago, Cuba. *Animal Biodiversity and Conservation*, 37.2: 127–139.
5. Dirzo R, Young HS, Galetti M, Ceballos G, Isaac NJB, Collen B. (2014). Defaunation in the Anthropocene. *Science*. 345(6195):401-6.
6. Suzan G, Garcia-Pena GE, Castro-Arellano I, Rico O, Rubio AV, Tolsa MJ, Roche B, Hosseini PR, Rizzoli A, Murray KA, Zambrana-Torrel C, Vittecoq M, Bailly X, Aguirre AA, Daszak P, Prieur-Richard AH, Mills JN, Guegan JF. (2015). Metacommunity and phylogenetic structure determine wildlife and zoonotic infectious disease patterns in time and space. *Ecol Evol* 5(4):865–873
7. Foley JA, DeFries R, Asner GP, Barford C, Bonan G, Carpenter SR, Chapin FS, Coe MT, Daily GC, Gibbs HK, Helkowski JH, Holloway T, Howard EA, Kucharik CJ, Monfreda C, Patz JA, Prentice IC, Ramankutty N, Snyderl PK. (2005). Global Consequences of land use. *Science* 309:570–574.
8. Mihaljevic, J. R. (2012). Linking metacommunity theory and symbiont evolutionary ecology. *Trends in Ecology and Evolution* 27(6):323– 329.
9. Su, S., Fu, X., Li, G., Kerlin, F., & Veit, M. (2017). Novel Influenza D virus: Epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics. *Virulence*, 8(8), 1580-1591.
10. García-García J, Ramos C. (2006). La influenza, un problema vigente de salud

pública. *Salud Pública de México*, 48(3), 244-26

11. Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, Waldenström J, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. (2006). Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science*, 312(5772):384-388. Available from: 10.1126/science.1122438
12. Reperant LA, Kuiken T, Osterhaus A. (2012). Adaptive pathways of zoonotic influenza viruses: from exposure to establishment in humans. *Vaccine*, 30(30):4419–34
13. Shao, W., Li, X., Goraya, M. U., Wang, S., & Chen, J. L. (2017). Evolution of Influenza A Virus by Mutation and Re-Assortment. *International journal of molecular sciences*, 18(8), 1650. doi:10.3390/ijms18081650
14. Horman, W., Nguyen, T., Kedzierska, K., Bean, A., & Layton, D. S. (2018). The Drivers of Pathology in Zoonotic Avian Influenza: The Interplay Between Host and Pathogen. *Frontiers in immunology*, 9, 1812. doi:10.3389/fimmu.2018.01812
15. Goneau LW, Mehta K, Wong J, L’Huillier AG, Gubbay JB. (2018). Zoonotic Influenza and Human Health—Part 1: Virology and Epidemiology of Zoonotic Influenzas. *Current Infectious Disease Reports*. 20(10): 37.
16. Gotelli, NJ. (2000). Null model analysis of species co-occurrence patterns. *Ecology*, 81, 2606–2621.
17. Leibold, M. A. and Mikkelsen, G. M. (2002), Coherence, species turnover, and boundary clumping: elements of meta-community structure. *Oikos*, 97: 237–250. doi:10.1034/j.1600-0706.2002.970210.x
18. Logue, J.B., Mouquet, N., Peter, H. & Hillebrand, H. (2011). Empirical approaches to metacommunities: a review and comparison with theory. *Trends in Ecology & Evolution*, 26(9); 482–491
19. Leibold, MA, Holyoak, M, Mouquet, N, Amarasekare, P, Chase, JM, Hoopes, MF, Holt, RD, Shurin, JB, Law, R, Tilman, D, Loreau, M & Gonzalez, A. (2004). The metacommunity concept: A framework for multi-scale community ecology. *Ecology letters*, 7(7); 601-613. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00608.x>
20. Datry, T., Bonada, N. and Heino, J. (2016). Towards understanding the

- organisation of metacommunities in highly dynamic ecological systems. *Oikos*, 125: 149–159. doi:10.1111/oik.02922
21. Stegen, J.C., Freestone, A.L., Crist, T.O., Anderson, M.J., Chase, J.M., Comita, L.S., Cornell, H.V., Davies, K.F., Harrison, S.P., Hurlbert, A.H., Inouye, B.D., Kraft, N.J.B., Myers, J.A., Sanders, N.J., Swenson, N.G. & Vellend, M. (2013) Stochastic and deterministic drivers of spatial and temporal turnover in breeding bird communities. *Global Ecology and Biogeography*, 22, 202–212.
  22. Fernandes IM, Henriques-Silva R, Penha J, Zuanon J, Peres-Neto PR. (2014). Spatiotemporal dynamics in a seasonal metacommunity structure is predictable: the case of flood- plain–fish communities. *Ecography* 37: 464–475.
  23. Veech JA. (2013). A probabilistic model for analysing species co- occurrence. *Global Ecology and Biogeography* 22(2):252–260
  24. Patrick, C. J., Cavanaugh, K., Konotchick, T., Peter, H. (2014). Quantifying co- occurrence patterns in space and time across aquatic systems with network analysis. *Eco-DAS X Chapter 1*, 2014, 1–13.
  25. OpenRefine. A free, open source, power tool for working with messy data [Internet]. [cited 1 nov 2016]. < <http://www.openrefine.org>>.
  26. Kahle, D and Wickham, H. (2013). ggmap: Spatial Visualization with ggplot2. *The R Journal*, 5(1), 144-161.
  27. R Core Team. (2016). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria(version 3.2.5). URL [https:// www.R-project.org/](https://www.R-project.org/).
  28. Holt BG, Lessard JP, Borregaard MK, Fritz SA, Araújo MB, Dimitrov D, Fabre PH, Graham CH, Graves GR, Jønsson KA, Nogués-Bravo D, Wang Z, Whittaker RJ, Fjeldså J, Rahbek C. (2013). An update of Wallace's zoogeographic regions of the world. *Science*. 339(6115):74-8.
  29. Dallas, T. (2014). metacom: an R package for the analysis of metacommunity structure. *Ecography*. 37: 402–405
  30. Presley, S.J., Higgins, C.L., & Willig, M.R. (2010). A comprehensive framework for the evaluation of metacommunity structure. *Oikos* 119, 908–917
  31. Widdowson MA, Bresee JS, Jernigan DB. (2017). The Global Threat of Animal

- Influenza Viruses of Zoonotic Concern: Then and Now, *The Journal of Infectious Diseases*. 216(4); 493–498 <https://doi.org/10.1093/infdis/jix331>
32. Almeida-Neto M, Guimaraes P, Guimaraes PR, Lodola RD, Ulrich W (2008). A Consistent Metric for Nestedness Analysis in Ecological Systems: Reconciling Concept and Measurement. *Oikos*, 117(8), 1227–1239.
  33. Álvarez-Mendizabal, P., García-Peña, GE., Mendoza-Gutiérrez, H., Tolsá García, MJ, Sotomayor-Bonilla, J., Goldstein, T., Suzan, G. (2018). Potential for West Nile virus transmission in metacommunities of birds and rodents. UNAM.
  34. Nieto-Rabiela F, Suzan G, Wiratsudakul A, and Rico-Chávez O. (2018). Viral metacommunities associated to bats and rodents at different spatial scales. *Community Ecology*. 19(2); 168-175
  35. Diederich S, Berhane Y, Embury-Hyatt C, Hisanaga T, Handel K, Cottam-Birt C, Ranadheera C, Kobasa D, Pasick J. (2015). Hemagglutinin-Neuraminidase Balance Influences the Virulence Phenotype of a Recombinant H5N3 Influenza A Virus Possessing a Polybasic HA0 Cleavage Site. *Journal of Virology*, 89(21):10724-34.
  36. Sharp, G. B., Kawaoka, Y., Jones, D. J., Bean, W. J., Pryor, S. P., Hinshaw, V., & Webster, R. G. (1997). Coinfection of wild ducks by influenza A viruses: distribution patterns and biological significance. *Journal of virology*, 71(8), 6128-35.
  37. Spackman E. (2009). The ecology of avian influenza virus in wild birds: What does this mean for poultry?, *Poultry Science*. 88(4); 847–850. <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00336>
  38. Capua I, Munoz O. (2013). Emergence of influenza viruses with zoonotic potential: open issues which need to be addressed. A review. *Veterinary Microbiology*, 165(1-2):7-12.
  39. Trevor M. Ellis, R. Barry Bousfield, Lucy A. Bissett, Kitman C. Dyrting, Geraldine S. M. Luk, S. T. Tsim, Katharine Sturm-ramirez, Robert G. Webster, Yi Guan & J. S. Malik P.(2010). Investigation of outbreaks of highly pathogenic H5N1 avian influenza in waterfowl and wild birds in Hong Kong in late 2002. *Avian Pathology*, 33:5, 492-505, DOI: 10.1080/03079450400003601



40. Kleyheeg, E, Slaterus, R, Bodewes R, Rijks JM, Spierenburg M, Beerens N, Kelder L, Marjolein JP, Stegeman JA, Fouchier RAM, Kuiken T, van der Jeugd HP. (2017). Deaths among Wild Birds during Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N8) Virus Outbreak, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*, 23(12), 2050-2054. <https://dx.doi.org/10.3201/eid2312.171086>.
41. Brown JD, Stallknecht DE. (2008). Wild bird surveillance for the avian influenza virus. *Methods in Molecular Biology*. 436:85-97. doi: 10.1007/978-1-59745-279-3\_11.
42. Reed KD, Meece JK, Henkel JS, Shukla SK. (2003). Birds, Migration and Emerging Zoonoses: West Nile Virus, Lyme Disease, Influenza A and Enteropathogens. *Clinical Medicine and Research*. 1(1):5-12.
43. Dugan, V. G., Chen, R., Spiro, D. J., Sengamalay, N., Zaborsky, J., Ghedin, E., Nolting, J., Swayne, D. E., Runstadler, J. A., Happ, G. M., Senne, D. A., Wang, R., Slemons, R. D., Holmes, E. C., Taubenberger, J. K. (2008). The evolutionary genetics and emergence of avian influenza viruses in wild birds. *PLoS pathogens*, 4(5), e1000076. doi:10.1371/journal.ppat.1000076
44. Qi X, An X, Jiao Y, Yu H, Xu K, Cui L, Wang S, Deng F, Huo X, Huang H, Dai Q, Bao C. (2018). Co-circulation of multiple genotypes of influenza A (H7N9) viruses in eastern China. *Archives of Virology*. 163(7): 1779-793.
45. Lu L, Lycett SJ, Leigh Brown AJ. (2014). Reassortment patterns of avian influenza virus internal segments among different subtypes. *BMC Evolution Biology*. 14:16. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-14-16>.

## Discusión general

### *Análisis de co-ocurrencia*

El análisis de co-ocurrencia realizado demuestra que prácticamente todos los pares de subtipos de influenza (en la región neártica y a nivel mundial) co-ocurren positivamente en las mismas especies de aves. Estas interacciones positivas nos permiten inferir la existencia de una baja o inclusive nula competencia entre subtipos coinfectantes en un mismo hospedero. A pesar de que nuestros datos no representan un proceso de coinfección en un mismo individuo, nos brindan un mejor panorama de como los diferentes subtipos pueden infectar a las mismas especies de aves o inclusive a un mismo individuo (o célula). Estudios han demostrado procesos de coinfección entre diferentes subtipos (Sharp et al. 1997), e inclusive coinfecciones entre genotipos del mismo subtipo (Qi et al. 2018).

Uno de los factores que favorece la coinfección entre diferentes subtipos se debe a la falta de protección inmunológica cruzada. Alelos divergentes de HA, NA y NS circulan en las mismas especies de aves en la misma región geográfica, favoreciendo una divergencia simpátrica (Dugan et al. 2008).

En el presente estudio se detectó que aquellos pares que eran considerados zoonóticos presentan un mayor tamaño de efecto que ellos pares no zoonóticos, así como con las combinaciones de zoonótico y no zoonótico. De acuerdo a los resultados podemos asumir que algunos pares de subtipos encontrados en las especies de aves son más comunes que otros subtipos, y que de estos pares, los que co-ocurren con mayor intensidad son aquellos considerados zoonóticos. A pesar de que en nuestro estudio no se considero la estacionalidad de las muestras, los hallazgos nos brindan información importante sobre aquellos subtipos más comunes en coinfecciones en aves, así como el impacto ecológico que las combinaciones de subtipos podrían tener dentro del hospederos y entre subtipos.

Cada subtipo de IA posee una probabilidad diferente de recibir o brindar genes a otros subtipos (Lu, Lycett, and Leigh Brown 2014), sin embargo estas dinámicas dependen de la combinación entre la epidemiología y la inmunidad basada en las distancias antigénicas (Shao et al. 2017). Los hallazgos de subtipos zoonóticos

presentando un mayor grado de co-ocurrencias en aves puede ser un posible indicador de como los subtipos, por un posible comportamiento cooperativo, son capaces de evadir la respuesta inmune del hospedero y así replicarse y transmitirse a nuevos hospederos.

Estos hallazgos nos pueden brindar información importante para la mejor implementación de campañas de vigilancia para la identificación de subtipos con potencial zoonótico, producto del reordenamiento durante coinfecciones. A pesar de que el origen de nuevos subtipos depende de una red compleja de genes, geografía y ecología, así como inmunidad y aptitud de los hospederos (Sharp et al. 1997; Dugan et al. 2008), puede ser posible que ciertos subtipos tiendan a co-ocurrir más comúnmente con otros subtipos zoonóticos pudiendo generar nuevos subtipos capaces de transmitirse a nuevos hospederos.

El virus de influenza representa una seria amenaza a la salud pública global, causando entre 250 mil y 500 mil muertes cada año alrededor del mundo (Shao et al. 2017). Buscar comprender la evolución del virus de influenza A es un gran reto, pero su estudio brindará mayor comprensión en los procesos ecológicos que le rigen. Estudiar la diversidad viral dentro de los hospederos no ha sido ampliamente estudiado, pero nos pueden brindar información importante sobre los procesos de reordenamiento entre segmentos... Los esfuerzos de vigilancia y los mecanismos de control ocurren año con año, sin embargo se requiere de buscar nuevos métodos para comprender la ecología de este virus, y así poder controlar la emergencia de brotes de IA.

La migración de algunas especies de aves es uno de los procesos que puede favorecer la transmisión y diseminación del virus de influenza. Sin embargo estudios filogenéticos han demostrado que existe una clara separación entre los linajes de aquellos subtipos provenientes del hemisferio este y aquellos del hemisferio oeste (Dugan et al. 2008). De la mayoría de las aves que han sido muestreadas en los distintos sitios migratorios, los subtipos aislados muestran una concordancia con la región en la que se presentan. Dichos subtipos presentan muy pocos genes provenientes del otro hemisferio, lo que indica que existe poca o nula sobrevivencia de los subtipos provenientes de otros hemisferios (Dugan et al.

2008). A diferencia de lo que se creía, la introducción de genes provenientes de otros hemisferios a una región no está dada en mayor medida por las aves migratorias, sino que proviene de la importación de aves para la industria productiva (Dugan et al. 2008).

Aparentemente estos procesos de reordenamiento y mutación son muy frecuentes en aves silvestres al momento de la replicación viral, lo cual favorece que exista una gran diversidad de combinaciones entre los subtipos HA y NA (Taubenberger 2010). En nuestro estudio se identificó la co-ocurrencia de los diferentes subtipos de influenza que han sido identificados en aves alrededor del mundo. Esta co-ocurrencia fue de carácter positiva, lo que quiere decir que entre los pares de subtipos identificados, no existe una “repulsión”. Los pares de subtipos de influenza están co-ocurriendo positivamente en las mismas especies, indicando un posible proceso de superinfección que pudiera estar ocurriendo en las aves silvestres. Con los datos que tenemos es difícil identificar las muestras que pertenecen a un mismo individuo, sin embargo las co-ocurrencias positivas nos muestran dicha posibilidad.

### *Metacomunidades*

Entre 1918 y 1919 un agente de etiología desconocida provocó una enfermedad respiratoria severa con un resultado fatal en un tercio de la población mundial (500 millones de personas) (Taubenberger et al. 2006). En el periodo de un año este patógeno había causado la muerte de 40 millones de personas en todo el mundo; más personas murieron por esta enfermedad que por los efectos de la 1ra Guerra Mundial (Johnson and Mueller 2002). Estudios han demostrado que la pandemia de influenza de 1918 fue causada por un virus de influenza tipo A de origen aviar, sin embargo las muestras obtenidas presentan una distinción genética de otros subtipos de influenza (Morens et al. 2010). Actualmente el origen de este patógeno permanece siendo un misterio.

Desde la pandemia de influenza de 1918, otras tres cepas han sido de importancia pandémica. La primera es la gripe asiática de 1957 provocada por un subtipo H2N2, posteriormente la gripe de Hong Kong de 1968 causada por un subtipo

H3N2, y finalmente la pandemia de 2009 por un subtipo H1N1 (Guan et al. 2010). Debido a las fuertes implicaciones que presenta este virus para la salud pública, esfuerzos de vigilancia y monitoreo para la detección de influenza ocurren alrededor del mundo. Posterior a la transmisión de un subtipo H5N1 de alta patogenicidad de aves a humanos en 1997, los esfuerzos por comprender la dinámica del virus de influenza tipo A y el rol que juegan los hospederos naturales (aves acuáticas) incremento en gran medida (Machalaba et al. 2015).

De acuerdo a los resultados obtenidos en el análisis de metacomunidades se pudieron identificar ciertos patrones de los programas de vigilancia de IA. Las estructuras anidadas encontradas en la región paleártica, oriental y sino-japonesa, así como a nivel mundial, muestran que existe un sesgo en los esfuerzos de muestreo del patógeno. Ciertas especies de aves son mayormente muestreadas, y en estas especies es en donde una mayor variedad de subtipos de influenza han sido identificadas. Especies que son menos muestreadas presentan una menor cantidad de subtipos. De acuerdo a la teoría de metacomunidades, estas aves con una menor diversidad de subtipos de influenza actúan como subgrupos de aquellas aves mayormente muestreadas y que cuentan con una mayor diversidad. El problema aquí radica en el hecho de que debido al sesgo de muestreo no podemos conocer el panorama completo de los virus y sus hospederos.

Con más de 10,000 especies de aves identificadas en el mundo, de acuerdo a nuestros estudios podemos identificar una grave falta de información. Únicamente contamos con registros de 241 especies de aves en donde el virus de influenza ha sido identificado, lo que corresponde a menos del 2.41% del total de las especies de aves. Las especies mayormente muestreadas son *Gallus gallus domesticus* y *Anas platyrhynchos*.

Para *Gallus gallus domesticus*, la importancia económica y productiva lo hace un blanco de gran importancia para su vigilancia. En 2018, el Departamento de Agricultura de Estados Unidos previó que la producción avícola alcanzará los 92.5 millones de toneladas de pollo (USDA, 2018). Esta información nos da una visión muy clara de la importancia económica de comprender la ecología del patógeno y su subsecuente monitoreo en esta especie. Es por lo anterior que los programas

de vigilancia deben de ser enfocados a prevenir que los virus de IA de alta patogenicidad alcancen a estas poblaciones, así como al desarrollo de programas adecuados de medicina preventiva que puedan ser implementados a nivel mundial.

La transmisión de virus de influenza de aves silvestres a domésticas ocurre principalmente por un contacto directo o indirecto entre los individuos (Alexander 2007). Esta transmisión ocurre principalmente con subtipos de baja patogenicidad y están limitados en tiempo y espacio (Bodewes and Kuiken 2018). Sin embargo como se mencionó anteriormente, estos subtipos pueden llegar a mutar y producir enfermedades letales en las poblaciones de aves domésticas, provocando mortalidades de hasta el 100%. El comprender la estacionalidad y prevalencia de los subtipos de influenza circulantes en las comunidades de aves en una región nos brindaría información importante para el desarrollo de programas adecuados y certeros para la detección oportuna de patógenos que pudieran afectar a las aves domésticas. Por otro lado estudios recientes han identificado una posible vía de transmisión de aves domésticas a aves silvestres. Por lo tanto los subtipos de influenza de alta patogenicidad que afectan a las aves domésticas podrían transmitirse a aves silvestres, ocasionando serios problemas de salud en estas poblaciones, lo que conlleva un impacto a la conservación de las diferentes especies. Realizar estudios y monitoreo constantes tanto en aves silvestres como en domésticas nos permitirá comprender con mayor precisión la ecología de este patógeno y poder hacer frente a las adversidades que se pudieran presentar en un futuro.

En el caso de *Anas platyrhynchos* la mayoría de los estudios a nivel mundial se centran en el monitoreo de esta especie y los subtipos de influenza que albergan. Se ha demostrado que esta especie puede actuar como un importante sitio de recombinación de subtipos de influenza (Sharp et al. 1997). Su comportamiento, distribución mundial y ecología hacen que *Anas platyrhynchos* sea considerado el principal repertorio de este virus (Olsen et al. 2006; Kang et al. 2016). Sin embargo, esto puede que no sea del todo cierto.

En un estudio realizado por Hoye et al., en 2010, 191 reportes de vigilancia de

aves silvestres de 1961 a 2007 fueron analizados. Los resultados mostraron que existe un considerable sesgo de muestreo hacia Anseriformes y Charadriiformes, así como hacía especies que son fácilmente capturadas o que se presentan en mayores concentraciones. Este sesgo de muestreo está relacionado con los métodos de muestreo (captura por ornitólogos y aves colectadas por cazadores) que se utilizan en vigilancia de enfermedades en aves silvestres. Los programas de vigilancia no están realizando una correcta representación de la diversidad de aves y sus abundancias relativas, por lo que podríamos estar dando por sentado la existencia de reservorios u hospederos potenciales para este patógeno.

La ecología del virus de IA está estrechamente vinculada a la ecología del huésped y a las características del ambiente donde habitan (Spackman 2009). Las aves silvestres albergan una amplia diversidad de subtipos de influenza, y la dinámica poblacional que presentan favorece la evolución y transmisión de este virus (Machalaba et al. 2015). Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, actualmente no conocemos la gran diversidad de subtipos y cepas que existen, ni las especies hospederas que contribuyen al mantenimiento y transmisión del virus. En los últimos años, se han realizado una mayor cantidad de estudios sobre aves terrestres (principalmente del orden Passeriforme), en lugar de aves acuáticas. En algunos estudios se ha identificado que aves como las codornices o los pavos actúan como amplificadores del virus de IA, lo que demuestra una posible conexión entre aves acuáticas silvestres y aves domésticas (Capua and Munoz 2013). Sin embargo, el papel epidemiológico que tienen estas aves aún no está claro (Fujimoto et al. 2015).

Supuestamente las aves acuáticas actúan como reservorios para el IAV, sin embargo, en los últimos años las enfermedades clínicas y en ocasiones letales en estas aves han ido en aumento (Machalaba et al. 2015). En 2002 en Hong Kong, un brote de H5N1 causó la muerte de aves acuáticas y otras especies de aves (*Phoenicopterus ruber*, *Egretta garzetta* y *Ardea cinerea*) (Trevor et al. 2010). En 2016, un H5N8 comenzó a circular en Europa causando la muerte de más de 13,600 aves silvestres en los Países Bajos, la mayoría de ellas de la especie *Aythya fuligula* y *Anas penelope* (Kleyheeg et al. 2017). La identificación de la

enfermedad causada por virus de IA de alta patogenicidad en aves silvestres es una gran preocupación para la conservación de las especies y modifica el paradigma de que las aves silvestres sean consideradas como reservorios del virus.

Los casos de influenza que afectan a las aves silvestres pueden estar relacionados con la forma en que los humanos pueden alterar la ecología del virus de IA. A pesar de que el impacto de nuestras acciones no se ha demostrado completamente, el comercio ilegal de especies silvestres y la liberación de especies exóticas puede jugar un papel fundamental en la diseminación de nuevos subtipos de influenza hacia nuevas áreas geográficas, donde las especies nativas no tengan protección inmune hacia el patógeno (Brown and Stallknecht 2008). Otros efectos antropogénicos, como el cambio climático y el desarrollo urbano, pueden alterar los patrones de migración y la dinámica de las poblaciones (Reed et al. 2003), impactando de igual manera en la ecología de los sistemas patógeno-hospedero.

Un reservorio se define como "cualquier objeto animado o inanimado o cualquier combinación de estos que sirva como hábitat para que un patógeno se reproduzca y pueda transmitirse a un huésped susceptible". Con esta definición es importante cambiar la forma en que consideramos a las aves silvestres, principalmente *Anas platyrhynchos*, como reservorios del virus de IA. Todavía no hemos entendido completamente el papel ecológico que tienen las diferentes especies hospederas, y cómo sus características y comportamiento de vida pueden alterar la diseminación del virus. Esto es motivo de gran preocupación para un desarrollo adecuado de los programas de vigilancia y para los esfuerzos de conservación que debemos comenzar a aplicar a las especies de aves en todo el mundo.



## Conclusiones

Las actividades del ser humano ejercen un fuerte impacto sobre los ecosistemas y las comunidades de especies que habitan en ellos. La gran mayoría de las veces dentro de estas comunidades no tomamos en cuenta a los patógenos a pesar de que son de gran importancia para la salud de los ecosistemas y sus habitantes. Diversos estudios han demostrado como los cambios antropogénicos influyen en las comunidades de patógenos, alterando su ecología, distribución, virulencia y diversidad de hospederos que pueden afectar.

El virus de Influenza es un patógeno que se ha visto afectado por dichas actividades antropogénicas. Los paradigmas que se conocían sobre las aves acuáticas actuando como reservorios o la diferencia existente entre subtipos del hemisferio este y hemisferio oeste, han cambiado. En los últimos años se han visto brotes de influenza en las poblaciones de aves silvestres, provocando la muertes de cientos e inclusive miles de aves en áreas determinadas. De igual manera, debido a la destrucción y fragmentación del hábitat, las aves han modificado sus patrones migratorios, y con ellos la posible diseminación de patógenos, incluyendo el virus de Influenza, a nuevos sitios con nuevos posibles hospederos. El impacto que el ser humano tiene sobre las comunidades de patógenos es real y es una situación que representa una seria alarma para la salud pública y animal, así como para el desarrollo de esfuerzos adecuados de conservación.

La diversidad viral de influenza es muy amplia por lo que si estudiamos el comportamientos de los diferentes subtipos dentro de un mismo hospedero y dentro de una misma región podremos llegar a resultados más claros y precisos. Es tiempo de que dejemos de pensar en que todos los patógenos son negativos y causan daño, porque de acuerdo a los analizado en este estudio, podemos llegar a las conclusiones de que la co-ocurrencia de diferentes subtipos de influenza puede provocar el subsecuente desarrollo de nuevos subtipos, sin embargo muchos de ellos no necesariamente de carácter zoonótico. Al conocer la diversidad viral podemos llegar a entender las complejas relaciones que existen entre los diferentes subtipos y el impacto que tienen en las poblaciones de aves.

Es de gran importancia que nos demos cuenta que los esfuerzo de vigilancia y monitoreo actuales no son los adecuados. Los programas ya no pueden ser enfocados al estudio de una sola especie o de un solo subtipo de influenza, y mucho menos hacia una visión antropocentrista. Debemos de comenzar a desarrollar programas que sean más integrales y en los cuales se analicen y estudien todos los componentes que forman parte de los sistemas patógeno-hospedero. Los programas de vigilancia y monitoreo deben de tomar en cuenta el aspecto de salud pública y salud animal, así como mantener un eje de conservación tanto de las aves como de los sitios de distribución de las especies. Vivimos en un mundo extremadamente complejo y dinámico, donde día a día ocurren cambios que alteran e irrumpen la función de los ecosistemas. Si queremos comprender el funcionamiento de las distintas partes que componen a un ecosistema debemos de, como seres humanos, vernos como parte de este gran todo y no como un elemento que se encuentra por encima del resto de las especies. Todo en este planeta esta relacionado, por lo que es importante que comencemos a darnos cuenta del impacto que nuestras acciones tienen sobre los distintos elementos que componen al planeta, incluyendo a aquellos tan pequeños como un virus.

## Referencias

1. Kruse H, Kirkemo AM, Handeland K. Wildlife as source of zoonotic infections. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(12):2067-72.
2. CDC. Middle East Respiratory Syndrome. Center of Disease Control and Prevention. 2014 [citado 2015 enero] ; 1 (1): Disponible en: URL <http://www.cdc.gov/coronavirus/mers/>
3. CDC. The 2009 H1N1 Pandemic. Center of Disease Control and Prevention. 2010 [citado 2015 enero] ; 1 (1): Disponible en: URL <http://www.cdc.gov/h1n1flu/cdcresponse.htm>
4. VanWormer L. Biodiversity, One Health, and Zoonotic Disease. UC Davis- HALI Project. 2013 [citado 2015 enero] ; 1 (1): Disponible en: URL [http://www.cbd.int/getattachment/health/africa/presentations/maputo\\_zoonotic\\_vanwormer.pdf](http://www.cbd.int/getattachment/health/africa/presentations/maputo_zoonotic_vanwormer.pdf)
5. Dirzo R, Young HS, Galetti M, Ceballos G, Isaac NJB, Collen B. (2014). Defaunation in the Anthropocene. *Science.* 345(6195):401-6.
6. Suzan G, Garcia-Pena GE, Castro-Arellano I, Rico O, Rubio AV, Tolsa MJ, Roche B, Hosseini PR, Rizzoli A, Murray KA, Zambrana-Torrel C, Vittecoq M, Bailly X, Aguirre AA, Daszak P, Prieur-Richard AH, Mills JN, Guegan JF. 2015. Metacommunity and phylogenetic structure determine wildlife and zoonotic infectious disease patterns in time and space. *Ecol Evol* 5(4):865–873
7. Foley JA, DeFries R, Asner GP, Barford C, Bonan G, Carpenter SR, Chapin FS, Coe MT, Daily GC, Gibbs HK, Helkowski JH, Holloway T, Howard EA, Kucharik CJ, Monfreda C, Patz JA, Prentice IC, Ramankutty N, Snyderl PK. 2005. Global Consequences of land use. *Science* 309:570–574.
8. Mihaljevic, J. R. 2012. Linking metacommunity theory and symbiont evolutionary ecology. *Trends in Ecology and Evolution* 27(6):323– 329.
9. Shao, W., Li, X., Goraya, M. U., Wang, S., & Chen, J. L. 2017. Evolution of Influenza A Virus by Mutation and Re-Assortment. *International journal of molecular sciences*, 18(8), 1650. doi:10.3390/ijms18081650
10. García-García J, Ramos C. 2006. La influenza, un problema vigente de salud

pública. *Salud Pública de México*, 48(3), 244-26

11. Su, S.; Fu, X.; Li, G.; Kerlin, F.; Veit, M. Novel influenza D virus: Epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics. *Virulence* **2017**; 8, 1580–1591.
12. Horman, W., Nguyen, T., Kedzierska, K., Bean, A., & Layton, D. S. (2018). The Drivers of Pathology in Zoonotic Avian Influenza: The Interplay Between Host and Pathogen. *Frontiers in immunology*, 9, 1812. doi:10.3389/fimmu.2018.01812
13. Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, Waldenström J, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. (2006). Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science*. 312(5772):384-388. Available from: 10.1126/science.1122438
14. Reperant LA, Kuiken T, Osterhaus A. (2012). Adaptive pathways of zoonotic influenza viruses: from exposure to establishment in humans. *Vaccine*, 30(30):4419–34
15. Alexander DJ. (2007). An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine*, 25(30) :5637–44. doi:10.1016/j.vaccine.2006.10.051
16. Abbas M, Abidin ZU. (2013). Proteins of Influenza Virus: A Review. *Journal of Infection and Molecular Biology*, 1(1): 1–8.
17. Diederich S, Berhane Y, Embury-Hyatt C, Hisanaga T, Handel K, Cottam-Birt C, Ranadheera C, Kobasa D, Pasick J. (2015). Hemagglutinin-Neuraminidase Balance Influences the Virulence Phenotype of a Recombinant H5N3 Influenza A Virus Possessing a Polybasic HA0 Cleavage Site. *Journal of Virology*, 89(21):10724-34.
18. Capua I, Munoz O. (2013). Emergence of influenza viruses with zoonotic potential: open issues which need to be addressed. A review. *Veterinary Microbiology*, 165(1-2):7-12.
19. Bodewes R, Kuiken T. (2018). Changing Role of Wild Birds in the Epidemiology of Avian Influenza A Viruses. *Advances in Virus Research*, 100:279-307. doi: 10.1016/bs.aivir.2017.10.007.
20. Ellis TM, Bousfield RB, Bissett LA, Dyrting KC, Luk GS, Tsim ST, Sturm-Ramirez K, Webster RG, Guan Y, Malik Peiris JS. (2004). Investigation of

- outbreaks of highly pathogenic H5N1 avian influenza in waterfowl and wild birds in Hong Kong in late 2002. *Avian Pathology*, 33(5):492-505.
21. Kleyheeg, E, Slaterus, R, Bodewes R, Rijks JM, Spierenburg M, Beerens N, Kelder L, Marjolein JP, Stegeman JA, Fouchier RAM, Kuiken T, van der Jeugd HP. (2017). Deaths among Wild Birds during Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N8) Virus Outbreak, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*, 23(12), 2050-2054. <https://dx.doi.org/10.3201/eid2312.171086>.
  22. De Graaf M, Fouchier RA. (2014). Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis. *EMBO Journal*, 33(8): 823–841.
  23. Sorrell, E. M., Schrauwen, E. J., Linster, M., De Graaf, M., Herfst, S., & Fouchier, R. A. (2011). Predicting 'airborne' influenza viruses: (trans-) mission impossible?. *Current opinion in virology*, 1(6), 635-42.
  24. Trevor M. Ellis, R. Barry Bousfield, Lucy A. Bissett, Kitman C. Dyrting, Geraldine S. M. Luk, S. T. Tsim, Katharine Sturm-ramirez, Robert G. Webster, Yi Guan & J. S. Malik Peiris (2010) Investigation of outbreaks of highly pathogenic H5N1 avian influenza in waterfowl and wild birds in Hong Kong in late 2002, *Avian Pathology*, 33:5, 492-505, DOI: 10.1080/03079450400003601
  25. Kleyheeg, E, Slaterus, R, Bodewes R, Rijks JM, Spierenburg M, Beerens N, Kelder L, Marjolein JP, Stegeman JA, Fouchier RAM, Kuiken T, van der Jeugd HP. (2017). Deaths among Wild Birds during Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N8) Virus Outbreak, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*, 23(12), 2050-2054. <https://dx.doi.org/10.3201/eid2312.171086>.
  26. Rosenzweig, M.L. (1995). *Species Diversity in Space and Time*. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
  27. Gianuca, A. T., Dias, R. A., Debastiani, V. J. and Duarte, L. D. S. (2014), Habitat filtering influences the phylogenetic structure of avian communities across a coastal gradient in southern Brazil. *Austral Ecology*, 39: 29–38. doi:10.1111/aec.12042
  28. Maurer, BA, Kembel SW, Rominger, AJ and. McGill BJ. (2013). Estimating metacommunity extent using data on species abundances, environmental

- variation, and phylogenetic relationships across geographic space. *Ecological Informatics*. 13:114–122
29. García–Quintas A & Parada Isada A. (2014). Effects of migrations on the nestedness structure of bird assemblages in cays of the Jardines de la Reina archipelago, Cuba. *Animal Biodiversity and Conservation*, 37.2: 127–139.
  30. Stegen, J.C., Freestone, A.L., Crist, T.O., Anderson, M.J., Chase, J.M., Comita, L.S., Cornell, H.V., Davies, K.F., Harrison, S.P., Hurlbert, A.H., Inouye, B.D., Kraft, N.J.B., Myers, J.A., Sanders, N.J., Swenson, N.G. & Vellend, M. (2013) Stochastic and deterministic drivers of spatial and temporal turnover in breeding bird communities. *Global Ecology and Biogeography*, 22, 202–212.
  31. Gotelli, N.J. (2000). Null model analysis of species co-occurrence patterns. *Ecology*, 81, 2606–2621.
  32. Leibold, M. A. and Mikkelsen, G. M. (2002), Coherence, species turnover, and boundary clumping: elements of meta-community structure. *Oikos*, 97: 237–250. doi:10.1034/j.1600-0706.2002.970210.x
  33. Gregorius HR, Gillet E, Ziehe M (2014) Relating measures of compositional differentiation among communities to conceptual models of migration and selection. *Ecological Modelling* 279: 24–35
  34. Datry, T., Bonada, N. and Heino, J. (2016), Towards understanding the organisation of metacommunities in highly dynamic ecological systems. *Oikos*, 125: 149–159. doi:10.1111/oik.02922
  35. Leibold, MA, Holyoak, M, Mouquet, N, Amarasekare, P, Chase, JM, Hoopes, MF, Holt, RD, Shurin, JB, Law, R, Tilman, D, Loreau, M & Gonzalez, A. (2004). The metacommunity concept: A framework for multi-scale community ecology. *Ecology letters*, 7(7); 601-613. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00608.x>
  36. Logue, J.B., Mouquet, N., Peter, H. & Hillebrand, H. (2011). Empirical approaches to metacommunities: a review and comparison with theory. *Trends in Ecology & Evolution*, 26(9); 482–491
  37. Mouquet M, Loreau, M. (2002). Coexistence in Metacommunities: The Regional Similarity Hypothesis. *The American Naturalist* 159(4): 420-426.

38. Simonis JL, Ellis JC. (2014). Bathing birds bias beta-diversity: frequent dispersal by gulls homogenizes fauna in a rock-pool metacommunity. *Ecology*. 95(6):1545-55.
39. Mouquet, N. and Loreau, M. (2003). Community patterns in source–sink metacommunities. *The American Naturalist*, 162(5): 544–557.
40. Fernandes IM, Henriques-Silva R, Penha J, Zuanon J, Peres-Neto PR. (2014). Spatiotemporal dynamics in a seasonal metacommunity structure is predictable: the case of flood- plain–fish communities. *Ecography* 37: 464–475.
41. Presley, S.J., Higgins, C.L., & Willig, M.R. (2010). A comprehensive framework for the evaluation of metacommunity structure. *Oikos* 119, 908–917
42. Holyoak, M, Leibold MA, Holt RD. (2005). *Metacommunities: spatial dynamics and ecological communities*. – Univ. of Chicago Press.
43. Henriques-Silva, R., Lindo, Z. and Peres-Neto, P. R. (2013), A community of metacommunities: exploring patterns in species distributions across large geographical areas. *Ecology*, 94: 627–639. doi:10.1890/12-0683.1
44. Patrick, C. J., Cavanaugh, K., Konotchick, T., Peter, H. (2014). Quantifying co-occurrence patterns in space and time across aquatic systems with network analysis. *Eco-DAS X Chapter 1*, 2014, 1–13.
45. Stubbs, W. J. and Wilson, J. B. (2004). Evidence for limiting similarity in a sand dune community. *Journal of Ecology*. 92: 557–567.
46. Krasnov, B.R., Pilosof, S., Stanko, M., Morand, S., Korralo-Vinarskaya, N.P. & Vinarski, M. V. (2013). Co-occurrence and phylogenetic distance in communities of mammalian ectoparasites: limiting similarity versus environmental filtering. *Oikos*. 123 (1), 63-70.
47. Volkov I, Banavar JR, Hubbell SP, Maritan A. (2003). Neutral theory and relative species abundance in ecology. *Nature*. 424(6952):1035-7.
48. Hubbell, SP. (2006). Neutral theory and the evolution of ecological equivalence. *Neutral Community Ecology*. 87 (6): 1387-1398.
49. Veech JA (2013) A probabilistic model for analysing species co- occurrence. *Glob Ecol Biogeogr* 22(2):252–260
50. Taubenberger, Jeffery K. and David M. Morens, (2006). 1918 Influenza: The

- Mother of All Pandemics. *Emerging Infectious Diseases* 12(1); 15–22.
51. Dugan VG, Chen R, Spiro DJ, Sengamalay N, Zaborsky J, et al. (2008). The Evolutionary Genetics and Emergence of Avian Influenza Viruses in Wild Birds. *PLoS* 4(5): e1000076. doi:10.1371/journal.ppat.1000076
  52. Nelson M & Holmes E. (2007). The evolution of epidemic influenza. *Nature reviews. Genetics*. 8. 196-205. 10.1038/nrg2053.
  53. Lu L, Lycett SJ, Leigh Brown AJ. 2014. Reassortment patterns of avian influenza virus internal segments among different subtypes. *BMC Evol Biol* 14:16. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-14-16>.
  54. de Silva UC, Tanaka H, Nakamura S, Goto N, Yasunaga T. (2012). A comprehensive analysis of reassortment in influenza A virus. *Biology Open*. 1(4):385-90.
  55. Ferguson, N. M., Galvani, A. P. & Bush, R. M. (2003). Ecological and immunological determinants of influenza evolution. *Nature* 422, 428–433. (doi:10.1038/nature01509)
  56. Johnson NPAS, Mueller J. (2002). Updating the accounts: global mortality of the 1918–1920 “Spanish” influenza pandemic. *Bulletin of the History of Medicine* 76:105–15
  57. Morens DM, Taubenberger JK, Harvey HA, Memoli MJ. (2010). The 1918 influenza pandemic: lessons for 2009 and the future. *Critical Care in Medicine*. 38:e10–20.
  58. Guan, Yi, Vijaykrishna D, Bahl J, Zhu H, Wang J, Smith GJ. (2010). The emergence of pandemic influenza viruses. *Protein and Cell*. 1. 9-13. 10.1007/s13238-010-0008-z.
  59. Machalaba CC, Elwood SE, Forcella S, Smith KM, Hamilton K, Jebara KB, Swayne DE, Webby R, Mumford E, Mazet JAK, Gaidet N, Daszak P, Karesh WB. (2015). Global avian influenza surveillance in wild birds: a strategy to capture viral diversity. *Emerging Infectious Diseases*. 21(4); <http://dx.doi.org/10.3201/eid2104.141415>
  60. Spackman E. (2009). The ecology of avian influenza virus in wild birds: What does this mean for poultry?, *Poultry Science*. 88(4); 847–850.



<https://doi.org/10.3382/ps.2008-00336>

61. Sharp GB, Kawaoka Y, Jones DJ, Bean WJ, Pryor SP, et al. (1997) Coinfection of wild ducks by influenza A viruses: distribution patterns and biological significance. *J Virol* 71: 6128–6135.
62. Qi, X., An, X., Jiao, Y. et al. Co-circulation of multiple genotypes of influenza A (H7N9) viruses in eastern China, 2016-2017. *Arch Virol* (2018) 163: 1779.
63. Almeida-Neto, M. et al. 2008. A consistent metric for nestedness analysis in ecological systems: reconciling concept and quantification. *Oikos* 117: 1227-1239.
64. Kang T, Kang Y-M, Jeong W, Moon O-K, Yoon H, Choi J, Lee H, Spring migration of mallards (*Anas platyrhynchos*) tracked by wild-tracker in East Asia, *Journal of Asia-Pacific Biodiversity* (2016), doi: 10.1016/j.japb.2016.06.009.
65. Brown JD, Stallknecht DE. (2008). Wild bird surveillance for the avian influenza virus. *Methods in Molecular Biology*. 436:85-97. doi: 10.1007/978-1-59745-279-3\_11.
66. Reed KD, Meece JK, Henkel JS, Shukla SK. Birds, Migration and Emerging Zoonoses: West Nile Virus, Lyme Disease, Influenza A and Enteropathogens. *Clinical Medicine and Research*. 2003;1(1):5-12.