



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA DIFERENTES
SUBTIPOS DEL VIRUS DE INFLUENZA A EN UNA
INTERFAZ AVES SILVESTRES- AVES Y CERDOS DE
TRASPATIO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA

CECILIA MONTOYA CARRILLO

Asesores:

Dr. Rafael Ojeda Flores

Dr. José Ivan Sánchez Betancourt

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 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.

DEDICATORIA

*Para Michito, mi compañera desde la infancia
hasta la conclusión de esta gran etapa,
que junto con Nucito y Pinole
me permitieron aprender durante todas mis clases.*

*A mi familia, a Pablo y mis amigos
por estar a mi lado en cada paso, por el apoyo para no rendirme
y siempre impulsarme a seguir creciendo*

***“Lo que importa no son las grandes ideas de los otros sino las
pequeñas cosas que se te ocurren a ti”***

Haruki Murakami

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores, el Dr. Rafael Ojeda Flores por brindarme la oportunidad de trabajar en este proyecto, compartirme su conocimiento y experiencias, además de motivarme a seguir en el área de investigación. Al Dr. José Ivan Sánchez Betancourt por asesorarme y tener siempre la disposición para resolver mis dudas durante todo el proyecto, en especial durante mi trabajo en laboratorio.

A mis compañeras y amigas Liliana Gaytán y Jessica Mateus, las cuales me han demostrado que el trabajo en equipo es posible, aunque en algunas ocasiones nos enfrentemos a una pared.

Al Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos y la Unidad de Investigación de la FMVZ por la capacitación, material e instalaciones durante el análisis de laboratorio. En especial a Carmen Gaitán, René Segura, Brenda Maya e Inocente Lara por las asesorías y colaboración durante el procesamiento de las muestras.

Al Laboratorio de Ecología de Enfermedades y Una Salud, particularmente a mis amigos Citlalli López, Deyra Ortiz, Concepción Pérez, Víctor Rodríguez, Laura Rojas, Adrián Serrano y Maricarmen Villalobos, por apoyarme durante la toma de decisiones a lo largo de este proyecto y hacerme reír cuando lo necesitaba

A mis amigos del Departamento de Reproducción, por hacer ameno el trabajo y estar dispuestos a compartir sus experiencias, especialmente a la Dra. Ana Rodríguez, por asesorarme en el diagnóstico serológico de enfermedades y durante mi investigación.

A mis amigas: Vanz, Jessy, Amaranta, Luz, Fer, Diana, Lety, Karla, Andrea por los consejos y el apoyo durante las clases, en especial fuera de la universidad.

A mi jurado por tomarse el tiempo para realizar recomendaciones valiosas para la conclusión de este trabajo.

A los productores y animales que permitieron la obtención de muestras e información para llevar a cabo este proyecto.

Al proyecto PAPIIT IA205916 por los recursos económicos para realizar esta investigación.

CONTENIDO

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	III
CONTENIDO	IV
LISTA DE CUADROS	VI
LISTA DE FIGURAS	VI
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
ETIOLOGÍA.....	3
FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA VARIABILIDAD DEL VIRUS.....	6
DINÁMICA EN LA TRANSMISIÓN DEL VIRUS DE INFLUENZA.....	7
DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DE INFLUENZA	11
PAPEL DE AVES Y CERDOS EN LA ECOLOGÍA DEL VIRUS DE INFLUENZA	
A.....	13
INFLUENZA AVIAR Y PORCINA EN MÉXICO.....	15
JUSTIFICACIÓN	18
HIPÓTESIS	19
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
ÁREA DE ESTUDIO	20
DISEÑO DE MUESTREO	20
CARACTERIZACIÓN DE LA INTERFAZ EN PRODUCCIONES DE	
TRASPATIO.....	21
REPLICACIÓN DE ANTÍGENOS VIRALES.....	23
TITULACIÓN VIRAL.....	25
INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN	26

RESULTADOS	28
CARACTERIZACIÓN DE LAS GRANJAS DE TRASPATIO.....	28
DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO.....	33
MODELO LINEAL GENERALIZADO.....	40
DISCUSIÓN	41
CONCLUSIONES.....	47
ABREVIATURAS	48
ANEXOS.....	50
ANEXO 1. Fechas de obtención de muestreos	50
ANEXO 2. Porcentaje de seroprevalencia por especie y subtipo viral.	50
ANEXO 3. Porcentaje de seroprevalencia por unidad de producción y subtipo viral.	51
ANEXO 4. Porcentajes de Seroprevalencia por granja, especie y quasiespecie de VIA.....	54
REFERENCIAS	58

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Principales funciones de las proteínas que conforman al virus de Influenza tipo A. *RNP = proteínas ribonucleicas. Modificado de: Munoz et al., (2016), Gramer R, (2005).	5
Cuadro 2. Clasificación de la información obtenida de encuestas por variable explicativa.	22
Cuadro 3. Resultados de variables explicativas por cada granja.....	30
Cuadro 4. Número de muestras obtenidas por especie y unidad de producción.	34
Cuadro 5. Co-seropositividad por granja.	38
Cuadro 6. Seropositividad en otras especies de aves.	39
Cuadro 7. Resultados del Modelo Lineal Generalizado.....	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del virus de Influenza A. Modificado de: Ian M. Mackay, doi.org/10.6084/m9.figshare.6817112.v1, (2018).	4
Figura 2. Transmisión interespecie e intraespecie del virus de Influenza. Las flechas sólidas representan la transmisión directa en una especie, las líneas punteadas señalan la infección esporádica. Modificado de: Joseph U et al. (2016)..	6
Figura 3. Localización de receptores celulares de ácido siálico en humanos, cerdos y aves. Modificado de: De Graaf M, Fouchier RAM, (2014).....	9
Figura 4. Prueba de Inhibición de la hemaglutinación. Modificado de: Mackay, Ian M. 10.6084/m9.figshare.6225218.v2, (2018).	13
Figura 5. Contacto directo entre cerdos y aves dentro de algunas de las granjas en Lerma, Estado de México..	29
Figura 6. Granjas muestreadas, donde se muestra la ausencia de cercas perimetrales para impedir el ingreso de aves silvestres.....	31

Figura 7. <i>Unidad de producción donde se observó la presencia de distintas aves domésticas como gallinas, guajolotes y patos.....</i>	32
Figura 8. <i>Ubicación geográfica de las granjas muestreadas en Lerma, Estado de México. En el centro se muestra la ubicación de la Ciénega de Chignahuapan, los puntos representan el tipo de animales que presentaba cada unidad de producción.</i>	33
Figura 9. <i>Seroprevalencia por unidad de producción, por subtipo y tipo de especie muestreada.</i>	35
Figura 10. <i>Prevalencia por especie y subtipo viral.....</i>	36
Figura 11. <i>Prevalencia por subtipo viral por cada unidad de producción muestreada.....</i>	37

RESUMEN

MONTOYA CARRILLO CECILIA. detección de anticuerpos contra diferentes subtipos del virus de influenza A en una interfaz aves silvestres- aves y cerdos de traspatio (bajo la dirección de: Dr. Rafael Ojeda Flores y Dr. José Ivan Sánchez Betancourt).

Los sistemas de traspatio propician interacciones entre animales domésticos, silvestres y humanos favoreciendo la transmisión del virus de Influenza A (VIA). A pesar del papel de aves acuáticas como reservorios y la participación de cerdos y aves como amplificadores virales, se conoce poco acerca de la exposición de estos animales de traspatio a VIA silvestres en México. El objetivo del estudio fue detectar la respuesta serológica de cerdos y aves de traspatio a distintos subtipos de VIA en una interfaz con patos silvestres del Estado de México. Se muestrearon 9 granjas dentro de un radio de 6 Km de la Ciénega de Atarasquillo, un área natural protegida y zona de conservación de aves durante la temporada invernal 2016-2017. Se realizó la prueba de inhibición de la hemaglutinación contra 10 subtipos de VIA: una variante viral de origen humano (H1N1), cuatro de origen porcino (H1N1, H3N2 y H5N2) y cinco provenientes de patos silvestres de la Ciénega (H1N1, H3N2 y H5N2). Para el subtipo H1N1, se detectó mayor seropositividad a la variante viral de origen porcino en ambas especies. La seroprevalencia de los subtipos H3N2 y H5N2 fue mayor hacia variantes virales de aves acuáticas. Se detectó seropositividad de 7.5% contra la variante viral LermaUIFMVZ377/2016(H5N2), aislado de un pato residente (*Anas platyrhynchos diazi*), relacionado con VIA de aves silvestres de las rutas migratorias del Pacífico (Alaska y Utah) y Mississippi (Arkansas). Por otro lado, mediante un modelo lineal generalizado se detectó una relación positiva de la seropositividad con la densidad de animales (>30 animales) y el autoconsumo ($p < 0.05$). Estos resultados demuestran que ciertos factores aumentan la tasa de contacto entre animales domésticos y la posibilidad de transmisión interespecie de VIA de aves migratorias. Lo que resalta la importancia de estudiar integralmente la dinámica del VIA en sistemas donde interactúan animales silvestres y domésticos para mejorar las acciones de monitoreo y control.

INTRODUCCIÓN

Los patógenos transmitidos por fauna silvestre o animales domésticos han causado más del 60% de las enfermedades infecciosas en humanos (1). Estas zoonosis representan la mayoría de las enfermedades infecciosas emergentes identificadas en personas en los últimos 70 años, generando una amenaza importante para la salud mundial (2,3). Uno de los patógenos con mayor impacto en la salud pública y animal es el virus de Influenza A (VIA). La Influenza es una enfermedad infecciosa respiratoria aguda, la cual tiene una distribución mundial, con una alta morbilidad y en algunas ocasiones altas tasas de incidencia y prevalencia que dependen del tipo de virus y la especie afectada (4). Este virus ha sido asociado con cerca de 14 pandemias en humanos desde el año 1500 (5), además de las epidemias anuales que se presentan cíclicamente. Estos eventos epidémicos han causado la muerte de millones de personas y enormes pérdidas económicas (6).

El VIA tiene la capacidad de infectar diversas especies como caballos, cerdos, aves, humanos, algunos mamíferos acuáticos e incluso murciélagos, es por ello, que estos virus se consideran una amenaza en salud pública debido a su potencial de transmisión interespecie (7). Se ha reconocido que la transmisión interespecie del virus se asocia principalmente a las interfaces donde existe contacto entre animales domésticos y humanos o animales domésticos y silvestres (8). En este sentido, a través de estudios filogenéticos recientes, se ha demostrado que las aves acuáticas actúan como la principal fuente de diversificación de los VIA que afectan a las diferentes especies que participan en la dinámica de la enfermedad (9). Asimismo, se han identificado ciertos factores antropogénicos que aumentan la probabilidad de contacto entre aves acuáticas con animales domésticos como la cercanía de actividades pecuarias a humedales o los sistemas de producción familiar que permiten la interacción de distintas especies domésticas y silvestres e incluso humanos.

La transmisión del VIA desafía constantemente las barreras interespecie, por tanto, existe una posibilidad constante de que surjan nuevos subtipos del virus con el potencial de afectar negativamente la salud pública y animal (10). Por lo cual, es necesario mantener un monitoreo y diagnóstico eficaz que permita desarrollar medidas de prevención y control adecuadas (11).

ETIOLOGÍA

El virus de influenza forma parte de la familia *Orthomyxoviridae* la cual está conformada por siete géneros: *Alphainfluenzavirus*, *Betainfluenzavirus*, *Gammainfluenzavirus*, *Deltainfluenzavirus*, *Quaranjavirus*, *Thogotovirus* e *Isavirus* (12), Los *Influenzavirus* presentan una cadena simple de RNA en sentido negativo, son virus envueltos de forma pleomórfica que miden de 80 a 120 nm y se encuentran divididos en cuatro especies: Influenza tipo A, B, C y D (7,13,14). Los tipos B y C infectan principalmente a humanos pero los síntomas son leves y su transmisión es mínima, por lo que, tienen un bajo potencial pandémico (13). Mientras que el tipo D solo ha sido aislado en cerdos y bovinos con signos clínicos menores y sin presentación en humanos (14). El virus de Influenza tipo A (VIA) infecta a un gran rango de hospederos, siendo una amenaza constante de salud pública a nivel mundial.

El genoma del virus de Influenza tipo A es de aproximadamente 13.6 kb y se encuentra dividido en 8 segmentos que codifican para 12 a 14 proteínas (15–17) (Figura y Cuadro 1), muchas de ellas son específicas por especie y pueden prevalecer e incluso mutar durante la transmisión interespecie e intraespecie (9). Algunos de los segmentos del genoma participan en la formación de glicoproteínas en la superficie del virus: Hemaglutinina (HA) y Neuraminidasa (NA), las cuales determinan en parte la virulencia del tipo viral en cuestión y permiten clasificar a los virus en subtipos.

Actualmente, se tienen registrados 18 subtipos de HA y 11 de NA. En aves silvestres se han detectado los subtipos H1 al H16 y N1 al N9 (18), mientras que los subtipos H17 y H18, y los N10 y N11 únicamente se han detectado en murciélagos (19) (Figura 2).

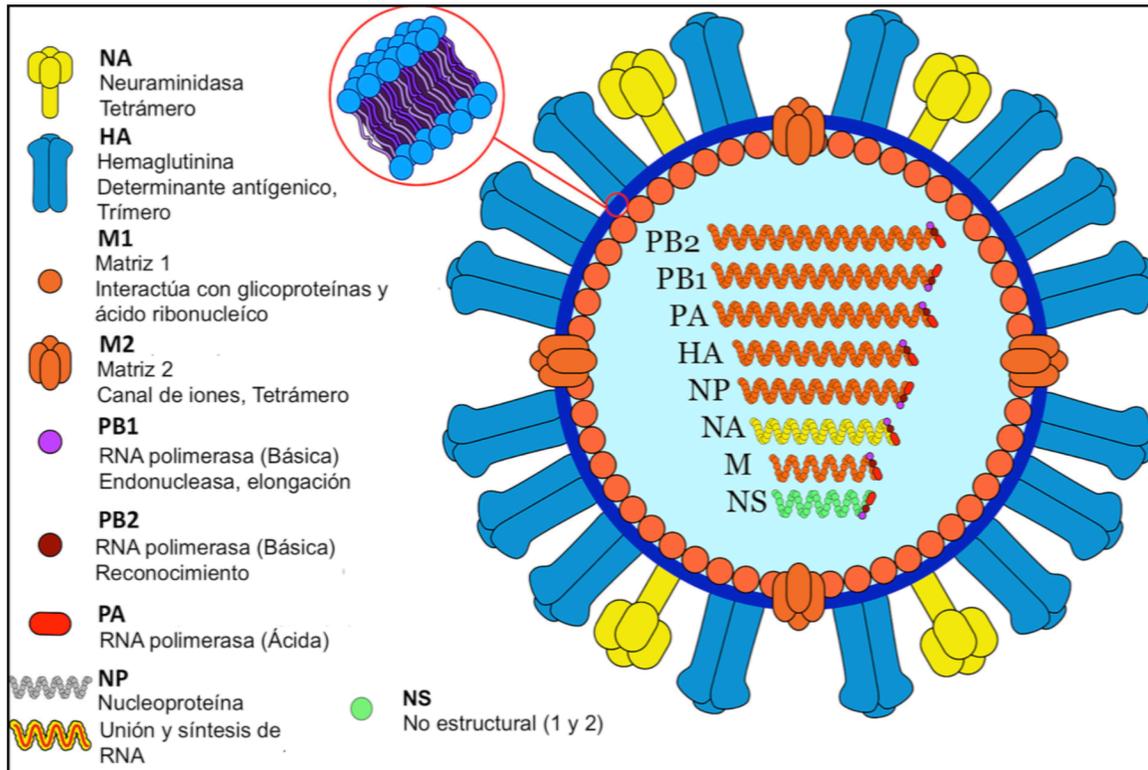


Figura 1. Estructura del virus de Influenza A. Modificado de: Ian M. Mackay, doi.org/10.6084/m9.figshare.6817112.v1, (2018).

Cuadro 1. Principales funciones de las proteínas que conforman al virus de Influenza tipo A. *RNP = proteínas ribonucleicas. Modificado de: Muñoz et al., (2016), Gramer R, (2005).

Segmento	Nombre de la proteína	Función de la proteína
1	Polimerasa básica 2 (PB 2)	Replicación viral, síntesis de RNA
2	Polimerasa básica 1 (PB 1)	Replicación viral, elongación del RNA
	PB – F2, – N 40	Actividad pro-apoptótica, inducción de la respuesta proinflamatoria
3	Polimerasa ácida (PA), PA – N182, PA – N15	Replicación viral, síntesis de RNA
	PA- X	Probable modulación de la expresión génica del hospedero (respuesta inmune)
4	Hemaglutinina (HA)	Glicoproteína de superficie con determinante antigénico, unión viral a receptores celulares, fusión de las membrana viral y endosomal
5	Nucleoproteína (NP)	Recubrimiento de RNA, transcripción de RNA, encapsidación
6	Neuraminidasa (NA)	Proteína de superficie con determinante antigénico, rompe uniones de ácido siálico, liberación viral de las células del hospedero
7	Matriz 1 (M1)	Estabilidad de la proteína de membrana, involucrada en la salida de RNP*
	Matriz 2 (M2)	Canal de iones transmembrana, permite la acidificación del endosoma, permite la salida de RNP*
8	No estructural 1 (NS1)	Antagoniza la respuesta inmune innata
	No estructural 2 (NS2)/ Proteína Exportadora Nuclear (NEP)	Regulación de transcripción de RNA, localización de RNP*

hospederos. A partir de este mecanismo regularmente se generan virus de tipo estacional (21,22). Por otro lado, cuando se infecta una sola célula hospedera con dos o más cepas virales diferentes, estas pueden presentar cambios en los segmentos del genoma viral. Esto puede generar cambios en las proteínas de la envoltura viral y como consecuencia, pueden generarse virus con nuevas propiedades, entre las que destaca, un aumento del potencial pandémico, este cambio genómico se denomina “*SHIFT*” o reordenamiento genético (21,22).

El reordenamiento genético facilita la formación de virus recombinantes con la capacidad de infectar diversas especies, incluyendo al ser humano. Por ejemplo, en 1918 algunos porcinos presentaron signos similares a los que causaba la “gripe española” en humanos. Estos signos fueron asociados a un subtipo de Influenza H1N1 de origen aviar (8,23). Posteriormente, se registraron otras pandemias relacionadas con el mecanismo “*SHIFT*” en virus de origen zoonótico (24). Una de ellas en Asia en 1957 con el subtipo H2N2 el cual presenta segmentos de RNA de origen aviar con remanentes del subtipo H1N1 humano (8,24,25). Tiempo después, en el año 1968 en Hong Kong ocurrió otro reordenamiento al mismo virus asiático (H2N2), el cual presentaba segmentos de hemaglutinina de origen aviar lo que provocó una nueva pandemia relacionada con un subtipo H3N2 (8,24,25). En 2009 se presentó la última pandemia registrada, cuando se detectó la presencia del VIA H1N1pdm09 en México, Estados Unidos y Canadá (26). Este nuevo subtipo viral presentó una triple recombinación de segmentos genéticos de un linaje porcino norteamericano y euroasiático, aviar y humano (8,16).

DINÁMICA EN LA TRANSMISIÓN DEL VIRUS DE INFLUENZA

Además de las características estructurales y genéticas del virus, la transmisión interespecie y el surgimiento de nuevas variantes virales se han asociado principalmente a diferentes interfaces que permiten el contacto entre animales y humanos (8). El origen de las pandemias es atribuido a diferentes factores, uno de ellos es la participación de reordenamientos virales en poblaciones donde

conviven más de una especie, como es el caso de producciones pecuarias donde la transmisión del virus se transmite de manera sencilla por el contacto directo con secreciones de animales infectados, fómites (27) e incluso algunos insectos que sugieren funcionar como vectores mecánicos debido a la detección de un subtipo H5N1 de origen aviar en moscas y mosquitos cercanas a granjas de aves de corral infectadas (28,29).

Uno de los factores determinantes en la transmisión del VIA es la presencia de receptores en las células hospedero susceptibles a la proteína HA del virus, para comenzar su replicación viral. Esta unión de virus-célula hospedero ocurre a través de receptores de ácido siálico, los cuales cambian en sitio y tipo dependiendo la especie afectada, razón por la cual la distribución anatómica de los receptores en las diferentes especies representan un factor importante en la replicación y transmisión del VIA (30,31).

El cerdo posee receptores α -2,6 galactosa en el tracto respiratorio superior y α -2,3 galactosa en el tracto respiratorio inferior, aunque se han encontrado en otros órganos como intestino, hígado, encéfalo, riñón y músculo (30,32). En aves se encuentran ambos receptores en tracto respiratorio e intestino pero en aves acuáticas se presenta en mayor proporción los receptores α -2,3 galactosa (31,33). En el humano se localizan en mayor cantidad los receptores α -2,6 galactosa ubicados en el tracto respiratorio superior, mientras que en bronquios se presentan en menor proporción α -2,3 galactosa y α -2,6 galactosa (30,34) (Figura 3). La diversidad en la distribución de receptores de ácido siálico en animales domésticos y el humano, sugiere mayores posibilidades para la entrada o infección de distintos subtipos del virus en un individuo con la posibilidad de mutar (34), como es el caso de del segmento HA de virus aviares (G226L, I55T, G186V y T160A) que permiten la unión a receptores α -2,6 galactosa, o bien mutaciones en la proteína PB2 (E627K) que permite la replicación de virus aviares en mamíferos (16) y con ello generar nuevas variantes.

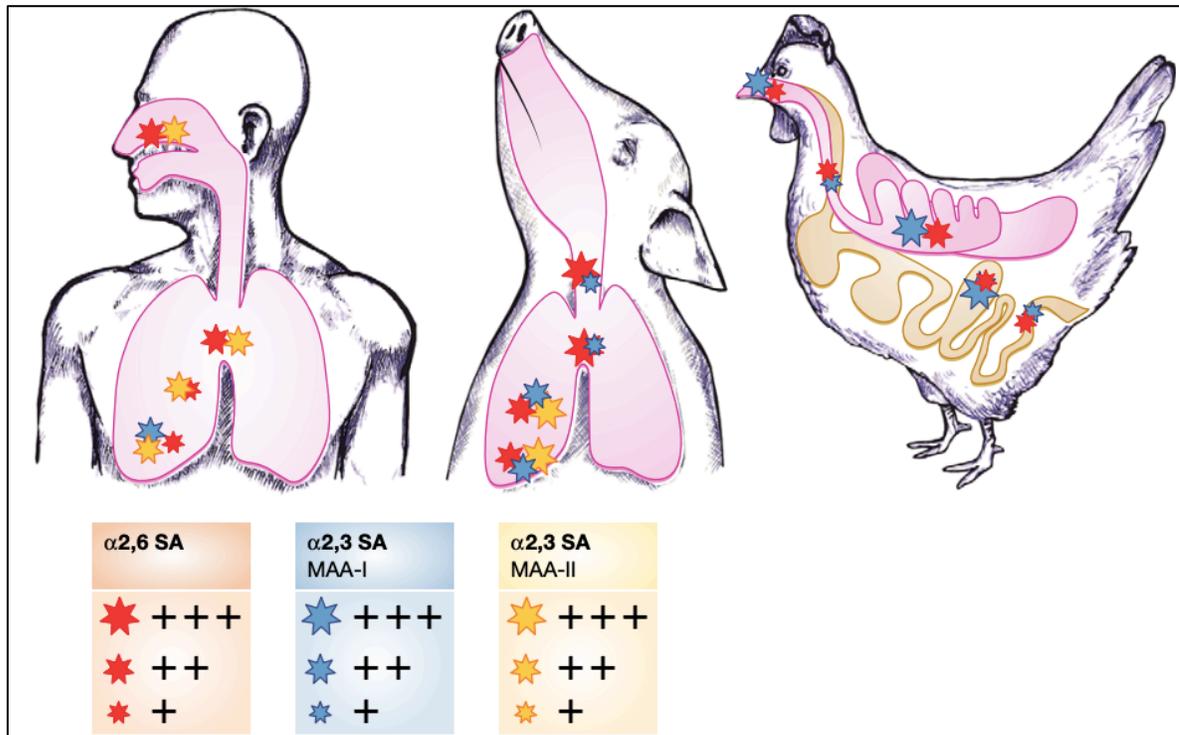


Figura 3. Localización de receptores celulares de ácido siálico en humanos, cerdos y aves. Modificado de: De Graaf M, Fouchier RAM, (2014).

Debido a las características en la cantidad, tipo y distribución de estos receptores celulares, los porcinos y las aves de corral son considerados hospederos amplificadores (16,35,36), es decir, que permiten el incremento en abundancia del patógeno y la probabilidad de ocurrencia (37). Sumado a esto, la riqueza de estos hospedadores en una comunidad y su interacción con otros individuos y especies, participan de manera importante en la dinámica de la enfermedad al favorecer la transmisión intraespecie e interespecie (37). Específicamente en México, se han aislado diferentes cepas de VIA que han demostrado que la especie porcina puede actuar como reservorio de genes virales provenientes de aves silvestres y humanos (38).

De acuerdo con lo antes descrito, el factor con mayor importancia para la diversificación y transmisión de VIA es el contacto del hospedero infectado con uno susceptible en un sitio donde convivan ambos, lo cual podemos describirlo a través de una interfaz. Una interfaz es definida como el límite a través del cual los

parásitos pueden pasar entre las comunidades biológicas (39). Una de las principales interfaces que participan en el mantenimiento de la diversidad del VIA, son los humedales, los cuales participan como zonas de descanso y alimentación de aves acuáticas. Estos sitios permiten la congregación de gran cantidad de aves acuáticas (*Anseriformes* y *Charadriiformes*), reconocidas como reservorios naturales de VIA de baja patogenicidad, en las cuales solamente causan signos clínicos leves o pueden pasar desapercibidos (40). La existencia de una alta densidad de aves en un sitio propicia el aumento de la tasa de contacto entre individuos infectados y susceptibles, lo cual permite la transmisión de patógenos de manera directa o bien, de manera indirecta a través del agua debido a las características del virus que permiten su persistencia en cuerpos de agua hasta por 30 días, dependiendo de variables como la salinidad, pH, temperatura, entre otras (41). En el caso del VIA, este virus se replica en el tracto digestivo de las distintas aves acuáticas y es eliminado en heces, donde puede transmitirse a otras aves que comparten el mismo hábitat, a lo largo de las rutas migratorias (27,42). Esto puede favorecer la transmisión y la evolución de los virus y aumentar la probabilidad de emergencia de nuevas variantes antigénicas (43), tal como lo ocurrido con el subtipo H5N1 proveniente de aves acuáticas con una transmisión interespecie a las aves de corral y humanos (44).

El incremento en la aparición de brotes epidémicos y epizooticos de VIA también intervienen factores medioambientales, en su mayoría ligados a perturbaciones antropogénicas. El contacto de aves silvestres con animales domésticos (por ejemplo, cerdos y aves) es mayor debido al crecimiento exponencial de la población humana y el consecuente aumento en la demanda de alimentos de origen animal (35,39,45). El actual proceso de urbanización se caracteriza por la rápida intensificación de actividades agropecuarias, cambios socioeconómicos y la fragmentación ecológica de las zonas naturales. Todas estas transformaciones generan grandes impactos y modifican de forma importante la epidemiología de enfermedades infecciosas (39,45). Uno de los factores antropogénicos que aumentan la tasa de contacto entre animales silvestres y domésticos además de

modificar la dinámica de las enfermedades infecciosas, es la producción de animales para consumo.

Muchas de las producciones pecuarias se realizan bajo un sistema de traspatio, el cuales se caracteriza por tener una estructura productiva donde la familia participa y se integra en los procesos de producción en espacios libres de la casa, que son aprovechados para la crianza de animales y actividades agropecuarias (46). Las instalaciones son hechas regularmente con materiales de desecho, no presentan manejo zootécnico o clínico adecuado y no existe un control para evitar el contacto con especies silvestres, por lo que se posee poca o nula bioseguridad. Estas características propician la transmisión de agentes infecciosos en distintas especies, entre ellos el virus de influenza A (47), a través del contacto directo con animales infectados (domésticos y silvestres) o de manera indirecta por medio de heces, recursos acuáticos y zonas de cultivo (48) En México, el sistema de producción familiar o de traspatio representa hasta el 85% de todas las producciones a nivel nacional (49). Sin embargo, a pesar de tener el conocimiento sobre el riesgo latente de estas producciones en la transmisión de la enfermedad, existen muchos vacíos en la vigilancia del virus en las distintas especies domésticas y silvestres.

DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DE INFLUENZA

Actualmente, existen múltiples pruebas diagnósticas útiles para detectar el virus de influenza en distintas especies. Los métodos de diagnóstico directos, detectan la infección por el virus en la fase aguda y se basan en la identificación de componentes virales a través de técnicas que permiten el aislamiento viral (huevo embrionado libre de patógenos específicos, líneas celulares de riñón de perro Madin-Derby: MDCK), la detección de antígenos virales (ELISA directo, inmunofluorescencia, inmunocromatografía) y la detección del genoma viral (RT-PCR) (50).

Por el contrario, los métodos de diagnóstico indirecto se basan en la respuesta inmune humoral contra el VIA a través de la detección de anticuerpos. La prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (IH) es la prueba estándar reconocida por la Organización Mundial de Salud Animal (OIE) para clasificar o subtipificar virus hemaglutinantes como es el caso de Influenza (51). Mediante la técnica de inhibición de la hemaglutinación, es posible detectar la respuesta inmune a la hemaglutinina. La HA tiene la capacidad de aglutinar los eritrocitos, cuando existe la fijación específica de anticuerpos a los sitios antigénicos de la proteína HA existe una interferencia, entre la HA y los eritrocitos, por lo que no se puede generar una aglutinación (51) (Figura 4). Complementario a la subtipificación se utiliza la prueba de Inhibición de la Neuraminidasa (IN) esto para detectar anticuerpos específicos contra la proteína NA (52).

Otras pruebas utilizadas como técnicas indirectas son la neutralización viral y el ensayo de ELISA indirecta, la cual utiliza VIA como antígeno y anticuerpos dirigidos contra IgG e IgA conjugados con una enzima, esta reacción de Ag-Ac es detectada a través de un cambio de color producido por la interacción de la enzima y su sustrato, que modifica al cromógeno para generar un producto detectable mediante espectrofotometría, esta última prueba cuenta con mayor sensibilidad pero debido al tiempo y pasos a realizar no se utiliza de forma rutinaria (53). Es por ello que la prueba de IH es viable, simple y económica, la detección de anticuerpos se puede encontrar a partir del día 7 post infección y reconoce la respuesta inmunitaria de subtipos específicos. Por consiguiente, permite conocer información epidemiológica de una zona, que resulta de gran utilidad para establecer acciones de monitoreo y medidas de control.

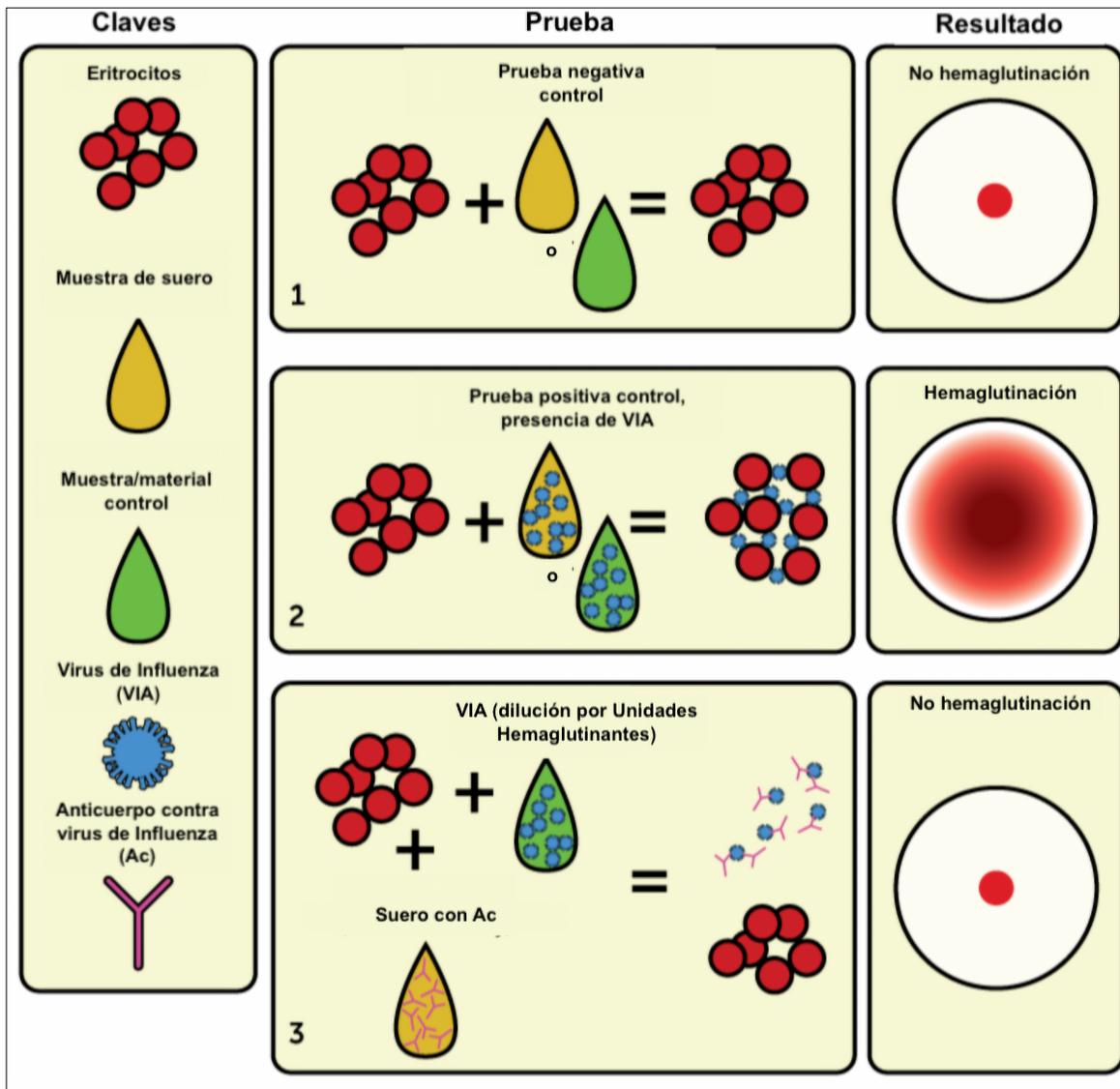


Figura 4. Prueba de Inhibición de la hemaglutinación. Modificado de: Mackay, Ian M. [10.6084/m9.figshare.6225218.v2](https://doi.org/10.6084/m9.figshare.6225218.v2), (2018).

PAPEL DE AVES Y CERDOS EN LA ECOLOGÍA DEL VIRUS DE INFLUENZA A

Como se menciona anteriormente, las aves y cerdos domésticos tienen un papel importante dentro de la dinámica de transmisión de VIA. El cambio del hábitat por zonas de explotación agropecuarias ha permitido el acercamiento de las aves acuáticas a animales domésticos como aves de corral (gallinas, pavos, patos, gansos, codornices, etc), las cuales son clave para la transmisión interespecie a

mamíferos gracias al reconocimiento, adaptación y replicación del virus en el sistema homólogo de receptores presente en aves acuáticas (α -2,3 galactosa) ubicado en tracto respiratorio y digestivo de aves de corral (30).

La presencia de VIA en aves de corral es similar a la descrita en aves acuáticas, solo se han encontrado los subtipos virales de HA son H1, H3, H5, H6, H7 y H9, pero ciertos linajes en los subtipos H5 y H7 pueden causar altas tasas de mortalidad por lo que son clasificados como de alta patogenicidad (VIAAP) (27,54). Los brotes por virus VIABP tienen una duración corta y una limitación geográfica, pero se han reportado casos a gran escala y de manera continua, como lo ocurrido con el subtipo H9N2 en el continente asiático (55). Sin embargo, en algunas ocasiones los virus de baja patogenicidad pueden mutar para convertirse en alta patogenicidad, ejemplo de ello es el subtipo H7N9 ocurrido en China (56). En 2018 se tiene reporte de la situación epidemiológica de los VIAAP presentes en aves domésticas: H5N1, H5N2 y H5N8 en África; H5N1, H5N2, H5N8, H7N3, H7N8 y H7N9 en América; en el continente asiático H5N1, H5N2, H5N3, H5N6, H5N8 y H7N9; mientras que en Europa se reportan los subtipos H5N1, H5N2, H5N5, H5N6, H5N8, H5N9 y H7N7 y por último en Oceanía solo se tiene registro del subtipo H7N2 (56).

Los cerdos al igual que las aves, son considerados hospederos amplificadores, esto se debe a la presencia de ambos receptores de ácido siálico presentes en aves (α -2,3 galactosa) y en humanos (α -2,6 galactosa) distribuidos en el tracto respiratorio del cerdo (34) y que han permitido reservar una diversidad genética viral con la posibilidad de generar un nuevo virus con potencial pandémico. Los cerdos son susceptibles de manera natural a la infección por subtipos H1N1 de origen aviar y humano, H3N2 y H1N2 recombinantes (57), no obstante existe una susceptibilidad de aproximadamente 28 a 38 virus aviares sin presentación de signos clínicos (58,59). Los VIABP que se han aislado en cerdo son H1N1, H3N1, H4N6, H5N2, H6N6, H7N2, H4N8, H5N1, H4N1 y H9N2; así mismo se han aislado subtipos de VIAAP como H7N7 y H5N1 (60–62).

Estos saltos taxonómicos se ven favorecidos por el contacto directo con animales enfermos o bien de manera indirecta a través de elementos abióticos. En el caso de una interfaz ave silvestre-ave doméstica es común este contacto cuando las aves migratorias coinciden con producciones de aves domésticas, como lo sucedido con el VIAAP H5N1 en pavos y patos domésticos facilitando su circulación en Asia (63,64). Sumado a esto, existe la posibilidad de transmisión a través del comercio de animales en mercados vivos donde conviven diferentes géneros de aves domésticas en lugares reducidos y que en ocasiones existe la venta de estas aves o subproductos de manera ilegal en el mismo sitio (43,65). La transmisión entre aves silvestres a mamíferos como los cerdos, puede ocurrir por la cercanía de granjas de porcinos a lagos o lagunas donde se congregan gran cantidad de aves acuáticas migratorias y residentes por ejemplo con el subtipo H4N6 en Canadá y Estados Unidos (66).

Por lo que se refiere a salud pública, la transmisión de VIAAv a humanos se debe a la exposición con aves domésticas en mercados de aves vivas e incluso por el trabajo directo con aves en granjas y rastros, algunos de los subtipos aviares aislados en humanos son: H5N1, H5N6, H7N2, H7N3, H7N7, H7N9, H9N2, H10N7 y H10N8 (27,43,67). De modo similar, la infección por subtipos de origen porcino (VIAPo) se presenta por contacto directo, los subtipos H1N1, H1N2, H3N2 se han detectado de manera molecular y serológica en humanos (68).

INFLUENZA AVIAR Y PORCINA EN MÉXICO

Existen diversas dependencias encargadas de la vigilancia epidemiológica del país, para ello se ha establecido el reporte de enfermedades y plagas exóticas y endémicas que pueden existir dentro del territorio nacional. El VIAPo se encuentra dentro del grupo 1 de notificación inmediata obligatoria a la excepción de los subtipos H1N1 y H3N2, asimismo se incluyen los VIAAP (H5 y H7) en aves. Los VIABP se encuentran dentro del grupo 2 donde se incluye el subtipo H5N2 (69). En México se han realizado diversos estudios que permiten conocer la situación

epidemiológica del país mediante análisis serológicos. En relación con los análisis, se ha evidenciado una seroprevalencia de VIAPo del subtipo H3N2 y H1N2 en la zona del Bajío de México de 54.76% y 25.74% respectivamente durante el año 2016. Simultáneamente en el Estado de México se comprobó la presencia de anticuerpos contra el subtipo H3N2 con un 33.33% y 0% para el subtipo H1N2 (60), sin embargo existe evidencia serológica de la circulación de este último subtipo en otros estados de la República desde el año 2010 (22). Con respecto al subtipo H1N1 se ha detectado hasta un 45.7% de seroprevalencia en diversos sistemas de producción (tecnificado, semitecnificado y de traspatio) en los estados de Guanajuato San Luis Potosí, Querétaro, Michoacán y Jalisco (70).

Por otro lado, el reporte de VIA en aves migratorias es insuficiente, pero se ha logrado el aislamiento del virus en algunas aves en Sonora (H5, H6, H7 y H9) y en el Estado de México con el subtipo H7N3 (71–73). Igualmente en el Estado de México, cercano a las Ciénegas de Lerma se detectó la presencia del subtipo H6N2 a través del uso de patos centinelas y el subtipo H4N2 de linaje norteamericano en muestras de agua durante el período de migración de aves silvestres (74,75). La investigación de VIA en aves domésticas ha demostrado la circulación de los subtipos H5N2 y H7N3 de alta y baja patogenicidad en el país desde 1993 (76,77). Sin embargo en el año 2012 se presentó un brote de VIAAv H7N3 de alta patogenicidad en gallinas ponedoras en el estado de Jalisco, teniendo un impacto en otros estados como Aguascalientes, Guanajuato, Oaxaca, Puebla, Chiapas, Querétaro y Veracruz, provocando así la muerte de pollos de engorda, reproductores, gallinas de postura, gallos de pelea, aves de traspatio e incluso algunas aves silvestres localizadas en cautiverio y reservas naturales (78,79).

A pesar de la existencia de estos datos, existen sesgos en la dinámica de transmisión de esta enfermedad, en especial durante una interfaz aves silvestres-aves y cerdos domésticos dentro de granjas de traspatio, puesto que son el principal sistema de producción del país y de las cuales se tiene poco monitoreo epidemiológico. Existen diversos elementos a evaluar dentro de esta interfaz como pueden ser ambientales, características del propio hospedero, tasa de contacto entre animales, manejo zootécnico, medidas de bioseguridad, contacto con fauna silvestre, entre otros (39,47). Por ello, es de suma importancia contemplar las relaciones entre patógeno-hospedero desde un punto de vista de múltiples hospederos y múltiples patógenos a múltiples escalas (80,81) con el objeto de comprender los mecanismos evolutivos involucrados en la persistencia del virus entre distintas especies.

JUSTIFICACIÓN

Los sistemas de producción de traspatio presentan características favorables para la diversificación del VIA, algunas de estas características son la diversidad de especies animales, una alta tasa de contacto y pocas medidas de bioseguridad. Estas variables permiten la posibilidad de co-circulación de múltiples subtipos del virus en aves, porcinos e incluso humanos que podrían causar la emergencia de nuevas variantes con riesgo pandémico. En México la mayoría de las granjas se ven representadas por este sistema de producción y la vigilancia epidemiológica en estos sitios tiende a ser insuficiente. Además, en ciertos casos, algunas de estas zonas forman parte de la ruta migratoria de diversas aves silvestres, por lo que el riesgo de incidencia es mayor. Por lo cual, es preciso realizar investigaciones en una interfaz que englobe especies domésticas y silvestres dentro de un ambiente propicio para la circulación del virus de Influenza, como son las producciones familiares cercanas a zonas de asentamiento de aves acuáticas. Para realizar estos estudios es necesario considerar herramientas de diagnóstico sencillas y económicas como son las técnicas serológicas, que permiten conocer el estado inmunológico de una animal durante y después de la infección viral. Asimismo realizar trabajos que permitan caracterizar la región de estudio con base en la correlación espacial entre las especies domésticas y silvestres en conjunto a factores sociales.

HIPÓTESIS

La respuesta inmunológica contra distintos subtipos del virus de Influenza A está asociada con la convergencia entre animales domésticos susceptibles y reservorios silvestres en una interfaz entre granjas de traspatio y zonas de migración de aves acuáticas. Un mayor potencial de transmisión se reflejará en altas tasas de detección de anticuerpos contra diferentes subtipos del virus en las especies domésticas de esta interfaz.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de anticuerpos a través de la prueba de inhibición de la hemaglutinación, contra diez diferentes subtipos de virus de Influenza A en sueros de cerdos y aves que confluyen en una interfaz entre producciones de traspatio y zonas de migración de aves acuáticas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Recolectar muestras sanguíneas en aves y cerdos domésticos de granjas de traspatio próximas a un sitio de descanso y alimentación de aves acuáticas durante la época de migración.
- Realizar la detección de anticuerpos contra diez subtipos del virus de Influenza A mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación.
- Evaluar la participación de factores zootécnicos y de bioseguridad en la presencia de anticuerpos contra virus de Influenza A en cerdos y aves de traspatio mediante el análisis de encuestas y datos de geolocalización.

MATERIAL Y MÉTODOS

ÁREA DE ESTUDIO

El estudio fue realizado en el municipio de Lerma, Estado de México, el cual cuenta con un Área de Protección de Flora y Fauna en las Ciénegas de Atarasquillo (Chignahuapan). Esta Área Natural Protegida (ANP) alberga diversas especies de fauna de las cuales se tiene registro de 256 especies de aves tanto residentes como migratorias, por ello es considerada Área de Importancia para la Conservación de Aves Silvestres (AICAS). Esta zona se ubica geográficamente en latitud 19°21'10.64" N y 99°30'18.26" O, la altitud oscila entre los 2,640 a 3,150 msnm. Predomina el clima templado subhúmedo con una temperatura promedio anual de 12.4°C y una precipitación pluvial de 1,075 mm por año.

DISEÑO DE MUESTREO

Para el estudio, se realizó un muestreo sanguíneo de cerdos y aves de corral (gallinas, guajolotes, gansos, patos) que se encontraban en producciones de traspatio cercana a la Ciénega de Chignahuapan, de diciembre de 2016 a mayo de 2017, cubriendo la temporada invernal de migración de aves acuáticas procedentes de Canadá y Estados Unidos. La obtención de muestras y datos acerca de cada unidad de producción, se realizó bajo la aprobación del Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales (CICUA) con el protocolo N° 574 .

Obtención de muestras en campo

La recolección de muestras se realizó mediante un muestreo de tipo oportunista a través de la autorización del dueño o productor de la granja. Igualmente se realizó una encuesta para conocer el estado general de cada producción.

Se obtuvieron muestras sanguíneas de cerdos y diversas aves domésticas (gallinas, guajolotes, patos domésticos). Las muestras provenientes de porcinos fueron tomadas a partir de la punción de la vena yugular mediante una jeringa (10 mL, aguja 18G) o un tubo para venopunción (Vacutainer®), esto dependiendo del peso y condición del animal. Con respecto a las aves, la muestra sanguínea se obtuvo a través de la vena radial utilizando una jeringa (5 mL, aguja 21 G). Para todas las especies, las muestras recolectadas se realizaron sin anticoagulante, fueron identificadas y transportadas a temperatura ambiente para su posterior proceso. La obtención de suero se realizó en el Área de Procesamiento de Muestras en el Departamento de Etología, Fauna Silvestre y Animales de Laboratorio (DEFSAL), las muestras se centrifugaron a 4°C durante 10 minutos con 1500 rpm (centrífuga Sorvall™ ST 16R, rotor TX-400), se colectó el suero en microtubos de 2 mL, los cuales se conservaron a -20°C para su posterior análisis.

CARACTERIZACIÓN DE LA INTERFAZ EN PRODUCCIONES DE TRASPATIO

Para determinar los factores que participan en la dinámica de transmisión de VIA en nuestro sitio de estudio, se realizó la obtención de datos (manejo zootécnico, niveles de bioseguridad) a través de encuestas a los dueños de las granjas (Cuadro 2), además se anotaron las coordenadas geográficas de cada una de ellas para el cálculo de distancia hacia el centro de la Ciénega de Chignahuapan. Los análisis de distancia fueron realizados a través de la función `earth.dist` de la librería `fossil` (82).

Cuadro 2. Clasificación de la información obtenida de encuestas por variable explicativa.

VARIABLE EXPLICATIVA	CATEGORÍAS	OBSERVACIONES
Tipo de granja (TG)	1	Solo con cerdos
	2	Solo con aves
	3	Presenta cerdos y aves
Número de animales (NºA)	1	Menos de 10 animales
	2	10 a 20 animales
	3	21 a 30 animales
	4	31 a 40 animales
	5	41 a 50 animales
	6	>51 animales
Distancia a la Ciénega (D)	Distancia en km	---
Destino de los animales (DA)	1	Venta al público en general
	2	Consumo familiar
	3	Venta a carnicerías
	4	Venta a público en general y consumo familiar
	5	Venta a carnicería y público en general
	6	Venta a carnicería, público en general y en mercado vivo
Bioseguridad (B)	1	Limpieza de corrales
	2	Vacunación/desparasitación
	3	Limpieza de corrales, vacunación/desparasitación
	4	Limpieza corrales, vacunación/desparasitación, comparte semental y existe un MVZ en común

Contacto entre cerdos y aves (C)	1 y 2	1. Si 2. No
Presencia de fauna silvestre (PFS)	1	Aves no acuáticas
	2	Roedores
	3	Aves no acuáticas y roedores
Presencia de aves acuáticas (PAA)	1 y 2	1. Si 2. No

Ninguna de las granjas fue vacunada contra algún subtipo de Virus de Influenza

Asimismo, se analizaron los valores obtenidos de la seroprevalencia con respecto a la información obtenida por cada unidad de producción a través de las entrevistas (elementos de bioseguridad y manejo zootécnico, distancia con respecto a los humedales con presencia de aves acuáticas). Para este análisis se utilizó la función glm de la paquetería Stats efectuada en el software libre R (83).

REPLICACIÓN DE ANTÍGENOS VIRALES

Los VIA utilizados en este estudio fueron obtenidos del almacenamiento viral localizado en la Unidad de Investigación (UI) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) y de aislamientos virales de patos silvestres del área de estudio en la temporada invernal 2016-2017, del proyecto PAPIIT IA-205916 (79). Los VIA empleados fueron los siguientes:

- A/Mexico/INER1/2000(H1N1)
- A/swine/Mexico/Mex19/2010(H1N1)
- A/swine/Mexico/Mex51/2010(H3N2)
- A/swine/Mexico/Mex52/2010(H1N1)
- A/swine/Mexico/GtoDMZC02/2014(H5N2)
- A/Mexican_duck/EstadodeMexico; Lerma/UIFMVZ377/2016(H5N2)
- A/green-winged_teal/EstadodeMexico; Lerma/UIFMVZ80/2016(H5N2)
- A/northern_shoveler/EstadodeMexico; Lerma/UIFMVZ613/2016(H5N2)

- A/Green-winged_teal/EstadodeMexico; Lerma/UIFMVZ465/2016(H3N2)
- A/blue-winged_teal/EstadodeMexico; Lerma/UIFMVZ322/2016(H1N1)

La replicación del virus se realizó en embriones de pollo (EP) libres de patógenos específicos (SPF) de entre 9 a 11 días de edad en el Laboratorio Nivel 3 del Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos (DMZC), siguiendo el siguiente procedimiento:

- Se revisó la viabilidad de los embriones y se descartaron los que se encontraban muertos y débiles.
- Con un lápiz se delimitó la cámara de aire y se marcó la posición del embrión. Se dejaron en incubación (37°C) por 24 horas antes de la inoculación.
- El sitio de inoculación se realizó en la cavidad alantoidea inoculando (200µl), utilizando una jeringa de insulina (27G x 33mm) con una inclinación de 90° a 5 mm de la cámara de aire y del lado contrario a la ubicación del embrión. El proceso fue realizado dentro de una campana de flujo laminar y se desinfectaron con alcohol al 70% cada uno de los EP (tres por cada subtipo viral).
- Se cubrió el orificio con pegamento blanco y se dejaron incubar a 37±2°C por 72 horas.
- Diariamente se revisaron los EP. Una vez muertos o finalizadas las 72 h de incubación, se colocaron en refrigeración por 2 h
- Para la colecta del líquido alantoideo se desinfectó con alcohol al 70% la zona de la cámara de aire y se cortó por la línea marcada previamente. Utilizando puntas estériles de 1000 µl, se depositó el líquido obtenido en tubos estériles de 15mL.
- El fluido se centrifugó a 3500 rpm (centrífuga Sorvall™ ST 16R, rotor TX-400) a 4°C por 10 minutos.

TITULACIÓN VIRAL

Antes de utilizar el virus obtenido, se realizó la titulación viral por medio de la técnica de Hemaglutinación en microplaca de la siguiente manera:

- Se utilizaron placas de 96 pozos con fondo “U”, donde se depositó en todos los pozos 50µl de Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS).
- Posteriormente, se agregaron 50µl del líquido alantoideo obtenido de cada EP (por duplicado) en la columna A y se realizaron diluciones dobles seriadas desde 1:2 hasta 1:4096.
- Para finalizar se depositaron 50µl de solución de eritrocitos al 0.5% en toda la placa.
- La lectura de la placa se realizó aproximadamente 30 minutos después, tomando en consideración el control de eritrocitos. El título se determinó a partir del último pozo donde se observó aglutinación (unión Ag – eritrocito). Se realizaron alícuotas de cada virus con su respectiva titulación y se conservaron en ultracongelación a -70°C.

El título viral se ajustó a cuatro unidades hemaglutinantes (UHA) para el suero proveniente de aves y a ocho UHA para el suero de porcinos.

INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN

El suero de distintos mamíferos contiene inhibidores inespecíficos que interfieren con la especificidad de la prueba. Por ello se realizó un tratamiento a los sueros provenientes de los cerdos para evitar falsos positivos.

Las muestras de sueros fueron inactivadas a baño María (56°C) por 30 minutos. En un nuevo tubo de 1.5mL se depositaron 200µl de suero, 400µl de caolín y 400µl de eritrocitos de ave al 5%, quedando así una dilución 1:5. Las muestras se dejaron en refrigeración (4°C) durante 24 h, para que tanto el caolín como los eritrocitos se sedimentaran. Después, se realizó la centrifugación de los tubos a 1500 rpm por 10 min (centrífuga Sorvall™ ST 16R, rotor TX-400) y se realizó la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (IH) con el sobrenadante. El diagnóstico serológico se realizó con la prueba IH método Beta (virus constante, suero diluido) con base en lo descrito en los Manuales de la OIE (84,85).

Procedimiento para suero procedente de cerdos

- En una microplaca de 96 pozos con fondo en “U” se agregaron 50 µl de PBS en todos los pozos. En la fila A se agregaron 50µl del suero adsorbido (sobrenadante y por duplicado), se realizaron diluciones dobles seriadas de la línea A a la H (desde 1:10 a 1:1280).
- Después se adicionaron 50µl de antígeno viral con 8 UHA de cada subtipo de VIA en cada pozo a partir de la línea B hasta la H. Esto para mantener la fila A como control de suero. Asimismo, se agregó un control de virus (50µl de PBS + 50µl de Ag de cada uno de los subtipos virales).
- Se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente y se adicionaron 50µl de eritrocitos de ave al 0.5% en cada pozo. Se consideró un control de eritrocitos (50µl de PBS + 50µl de eritrocitos de ave al 0.5%). Posteriormente se dejó incubar nuevamente a temperatura ambiente hasta que el control de eritrocitos sedimentó.

- El título de cada suero se consideró con base al último pozo donde se observó sedimentación (debido a la falta de unión del virus a los eritrocitos por acción de los Ac). Se consideraron positivas las muestras con títulos mayores o iguales a 1:80 (85,86).

Procedimiento para suero procedente de aves

- En una microplaca de 96 pozos con fondo en “V” se colocaron 25µl de PBS en todos los pozos. En la línea A se agregaron 25µl de suero problema (por duplicado) y se realizaron diluciones dobles seriadas de la línea A a la H (desde 1:2 hasta 1:256).
- Después se adicionaron 25µl de antígeno viral con 4 UHA de cada subtipo viral en cada pozo a partir de la línea B hasta la H (fila A control de suero) y se dejó incubar por 30 minutos a temperatura ambiente. Se anexó control de virus (25µl de PBS + 25µl Ag de cada VIA).
- Se agregaron 25µl de eritrocitos de ave al 1% en cada pozo, se añadió un control de eritrocitos (25µl de PBS + 25µl de suspensión de eritrocitos de ave al 1%). Posteriormente se dejó incubar nuevamente a temperatura ambiente hasta que se observó sedimentación en el control de eritrocitos.
- La prueba de IH se consideró positiva si un suero causa la inhibición completa de 4 UHA de antígeno. La aglutinación se evaluó inclinando las placas, solo los pozos en los que los glóbulos rojos fluían a la misma velocidad que los pozos de control, se consideraron con una inhibición completa. El título fue igual o mayor a 1:16.

Los resultados positivos que se alcanzaron tanto de cerdos como aves domésticas se transformaron a una medida de presencia/ausencia (1/0) para la obtención de la seroprevalencia por granja, especie y subtipo usando la función epi.preval de la librería epi.R (87).

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN DE LAS GRANJAS DE TRASPATIO

Las unidades de producción muestreadas se encontraron a una distancia menor de 6 km del centroide de la Ciénega de Chignahuapan (19.35366 N, 99.50416 O), además de encontrarse cercanas a caminos y carreteras. En el área donde ocurre la caza cinegética, existe un gran movimiento de estos animales a través de los cazadores y personas que viven en la misma localidad llamados “pateros”. La manipulación de los patos cazados se realiza a orillas del humedal, donde se evisceran sin medidas de higiene para los “pateros” y para el ambiente debido a los restos de las carcazas. Asimismo existe el riesgo en salud pública y animal debido al transporte de los patos a los hogares para su consumo, de los cuales muchos cuentan con animales domésticos en sistemas de traspatio.

Las granjas fueron clasificadas por la cantidad de individuos además del tipo de animales que presentaban: 1. Cerdos, 2. Aves y 3. Cerdos y aves, seis de las granjas se clasificaron con ambas especies, dos con solo presencia de aves y solo una granja con porcinos. El contacto entre cerdos y aves se reportó en todas las granjas clasificadas con ambas especies (Figura 5). Posteriormente se clasificó el destino de los animales en seis categorías, donde la mayoría de los productores tienen a los animales para su autoconsumo y la venta al público en general. Los aspectos que se categorizaron para la bioseguridad fueron la limpieza de corrales, vacunación/desparasitación, si se compartían sementales y la existencia de un Médico Veterinario en común (Cuadro 3). Sumado a esto, ninguna de las unidades de producción reportan algún esquema de vacunación contra virus de Influenza A.



Figura 5. *Contacto directo entre cerdos y aves dentro de algunas de las granjas en Lerma, Estado de México.*

Cuadro 3. Resultados de variables explicativas por cada granja

GRANJA	TG	NºA	D (KM)	DA	B	C	PFS	PAA
1	3	6	1.975	1	3	1	1	0
2	3	6	1.782	5	4	1	1	0
3	2	3	1.404	2	1	0	3	1
4	3	4	2.624	1	4	1	1	0
5	3	5	5.668	4	4	1	3	0
6	3	3	4.006	6	4	1	2	1
7	2	4	1.097	2	2	0	1	0
8	3	3	1.227	3	4	1	1	0
9	1	6	3.463	4	2	0	1	0

TG= tipo de granja, NºA= número de animales, D= distancia a la Ciénega, DA= destino de animales, B= bioseguridad, C= contacto entre aves y cerdos, PFS= presencia de fauna silvestre, PAA= Presencia de aves acuáticas.

La presencia de fauna silvestre se reportó en todas las granjas, los productores han observado roedores dentro de su propiedad además de diversas aves cercanas a la misma como: garzas (*Ardea alba*, *Bubulcus ibis*, *Egretta thula*), garcetas (*Butorides virescens*), cernícalos (*Falco sparverius*), tordos (*Euphagus cyanocephalus*, *Molothrus aeneus*, *Agelaius phoeniceus*), zanates (*Quiscalus mexicanus*), lechuzas (*Tyto alba*), búhos (*Bubo virginianus*), zopilotes (*Zopilote aura*), ibis (*Plegadis chihi*) y gorriones (*Passer domesticus*) (79). Solo dos productores reportaron el avistamiento de aves acuáticas cercanas a sus granjas (Granja 3 y 6). Además en ninguna granja se observó cercas perimetrales que impidan la entrada de estas aves ni otros animales silvestres (Figura 6).



Figura 6. *Granjas muestreadas, donde se muestra la ausencia de cercas perimetrales para impedir el ingreso de aves silvestres.*

Las únicas unidades de producción que presentaron patos domésticos dentro de su propiedad fueron la granja 3 y 6 reportando que son para su autoconsumo (Figura 7).



Figura 7. *Unidad de producción donde se observó la presencia de distintas aves domésticas como gallinas, guajolotes y patos.*

DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO

Se obtuvieron 115 muestras de suero provenientes de porcinos, 69 de gallinas, 11 de guajolotes, cinco de patos domésticos y una muestra de un ganso (Cuadro 4). Estas muestras se tomaron de nueve producciones de traspatio localizadas alrededor del centroide de la Ciénega de Chignahuapan (Figura 8).

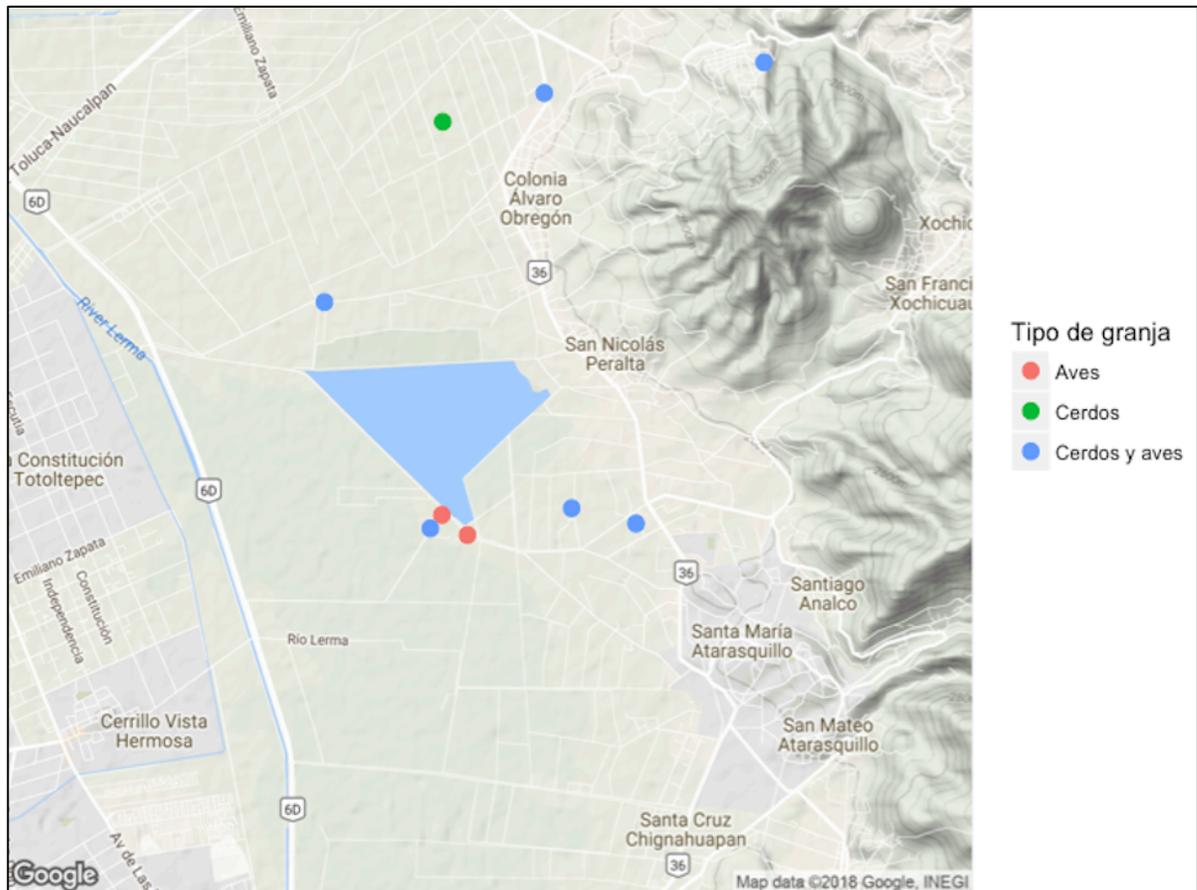


Figura 8. Ubicación geográfica de las granjas muestreadas en Lerma, Estado de México. En el centro se muestra la ubicación de la Ciénega de Chignahuapan, los puntos representan el tipo de animales que presentaba cada unidad de producción.

Cuadro 4. *Número de muestras obtenidas por especie y unidad de producción.*

GRANJA	CERDO	GALLINA	GUAJOLOTE	PATO DOMÉSTICO	GANSO
1.	4	9	0	0	0
2.	37	3	1	0	0
3.	0	7	8	3	0
4.	12	6	0	0	0
5.	16	13	0	0	0
6.	11	4	1	2	1
7.	0	14	0	0	0
8.	15	13	1	0	0
9.	20	0	0	0	0
TOTAL	115	69	11	5	1

Se realizó la prueba de inhibición de la hemaglutinación a un total de 201 muestras contra 10 diferentes cepas de virus de Influenza, de las cuales 180 (73 de ave y 107 de cerdo) resultaron positivas a serología. Ninguna de las granjas presentó seropositividad por los subtipos INER1/H1N1(humano) ni GtoDMZC02/H5N2(porcino). Asimismo ningún de los sueros porcinos resultó positivo a ninguno de las variantes virales del subtipo H5N2.

Los mayores títulos de anticuerpos se observaron en los subtipos virales Mex19/H1N1 (1:1280), UIFMVZ465/H3N2 (1:640) y UIFMVZ322/H1N1 (1:640) en cerdos. Con respecto a las aves el título mayor fue de 1:256 en los virus Mex19/H1N1, UIFMVZ465/H3N2 y UIFMVZ377/H5N2 (Figura 9).

La seropositividad general por los subtipos de origen porcino detectado en aves domésticas fue de 81.93% para Mex19/H1N1, 25.68% para Mex51/H3N2 y 62.43% para el subtipo Mex52/H1N1. Mientras que la prevalencia para los subtipos aislados en aves acuáticas fue de 62.18% para el virus UIFMVZ322/H1N1, 37.95% para UIFMVZ465/H3N2. En el caso de los

aislamientos del subtipo H5N2 los resultados fueron de 7.5%, 36.75% y 4.42% para los virus UIFMVZ377/H5N2, UIFMVZ613/H5N2 y UIFMVZ80/H5N2, respectivamente. Por otro lado, las frecuencias en la especie porcina fueron de 69.75% para el subtipo viral Mex19/H1N1, 9.75 % para Mex51/H3N2 y 45.82% para Mex52/H1N1; en los subtipos virales de origen silvestre el porcentaje fue de 28.99% (UIFMVZ465/H3N2) y 60.78% (UIFMVZ322/H1N1) (Figura 10)(Anexo 2).

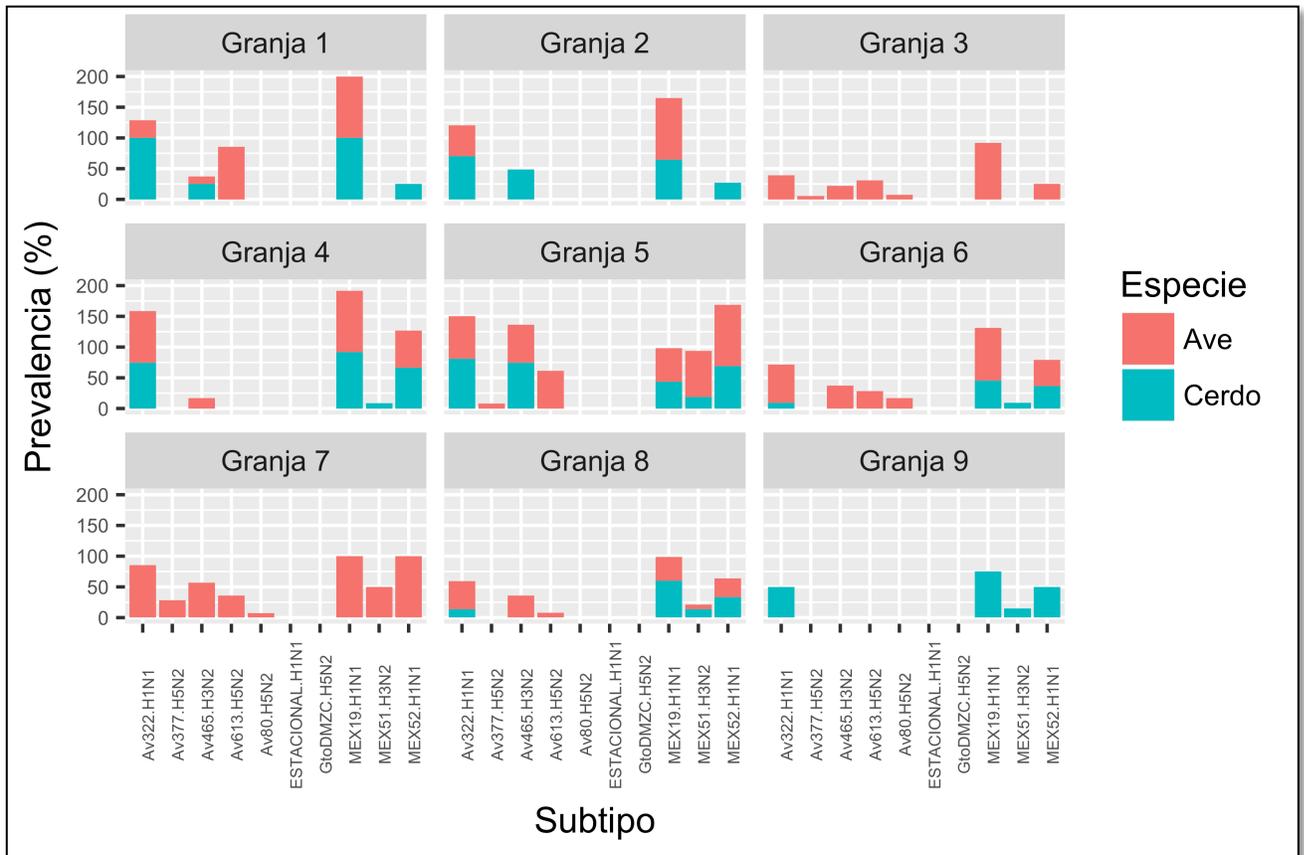


Figura 9. Seroprevalencia por unidad de producción, por subtipo y tipo de especie muestreada.

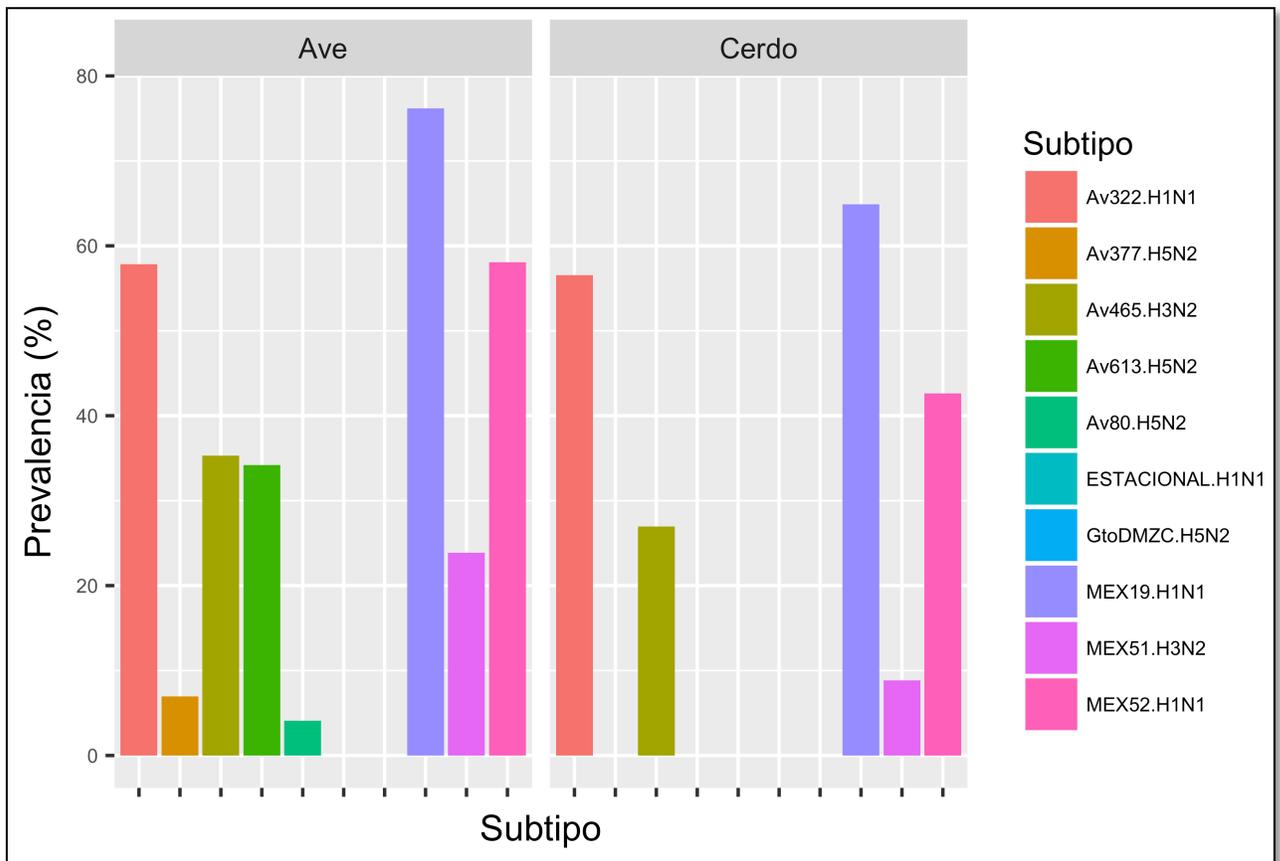


Figura 10. Prevalencia por especie y subtipo viral.

En todas las granjas muestreadas, se observó seropositividad a los aislamientos virales del subtipo H1N1, sin embargo solo las granjas número 3 (1:256), 5 (1:32) y 7 (1:16 a 1:32) presentaron evidencia serológica contra la variante viral UIFMVZ377/H5N2 (Figura 11). Por otra parte, la granja número 9 solo presentó exposición a un virus de origen silvestre (UIFMVZ465/H3N2) (Anexo 3).

En todas la producciones se observó diferencia en la seropositividad entre los aislamientos virales de origen porcino y de aves silvestres (Anexo 4). En las granjas 1, 3, 6, 7 y 8 la frecuencia de anticuerpos en aves domésticas fue mayor contra el virus H3N2 de origen silvestre y en las granjas N° 1, 2 y 5 en la especie porcina. En cambio con el subtipo H1N1, en los cerdos predominó el subtipo silvestre en las unidades de producción N° 1, 2 y 5, pero solo destacó en gallinas una sola granja (N° 8). En el resto de los sitios muestreados la seropositividad del

subtipo H1N1 fue mayor con la variante viral Mex19/H1N1 a excepción de la granja 5, donde el mayor porcentaje se detectó con la variante viral Mex52/H1N1.

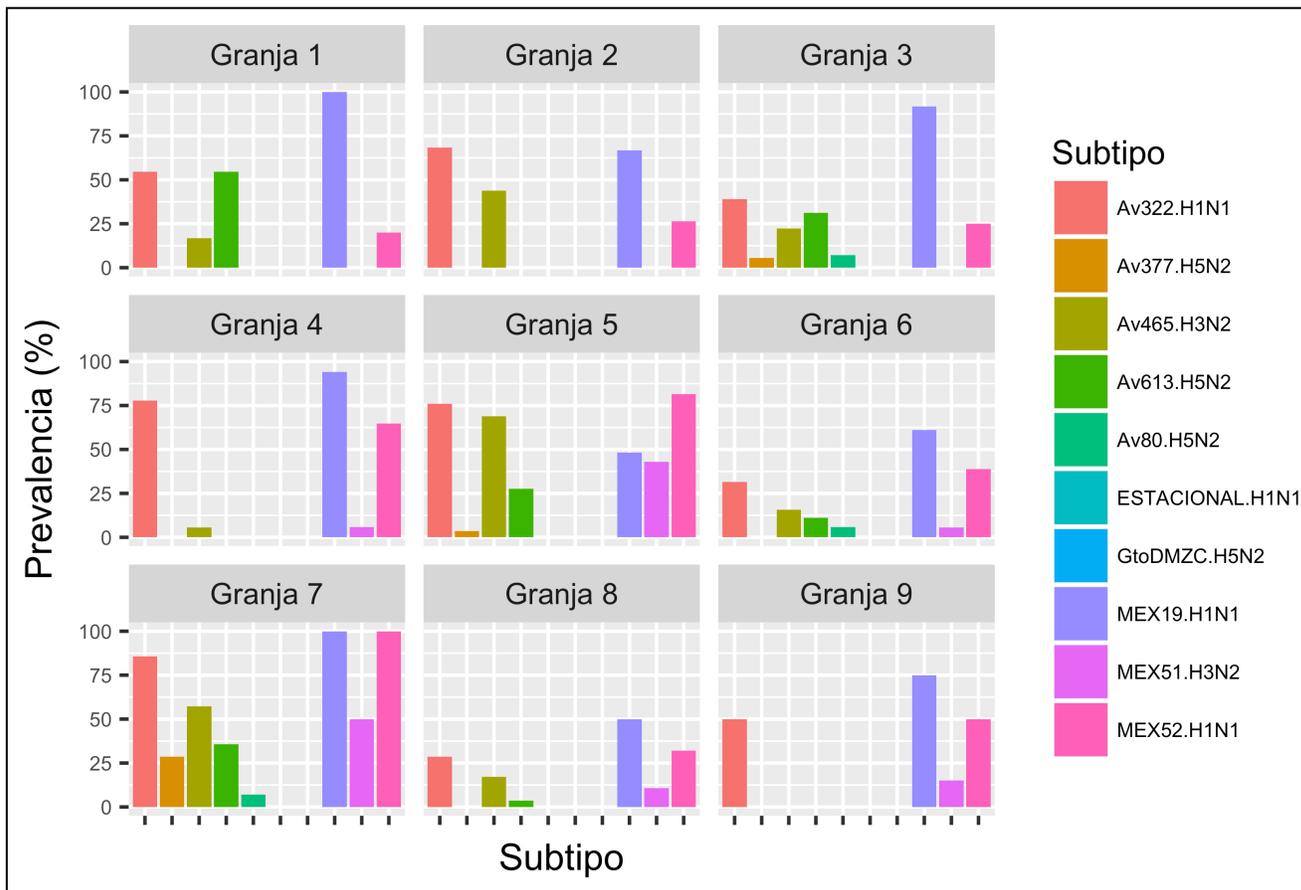


Figura 11. Prevalencia por subtipo viral por cada unidad de producción muestreada.

Por lo que se refiere a los resultados de co-seropositividad por especie, la mayor detección de anticuerpos contra más subtipos de VIA se encontró en gallinas, con hasta seis variantes virales, por el contrario en la especie porcina solo se encontraron anticuerpos contra cuatro variedades (Cuadro 5). La unidad de producción con mayor co-seropositividad fue la N° 7 con animales positivos a todos los aislamientos virales de patos (UIFMVZ322/H1N1, UIFMVZ377/H5N2, UIFMVZ465/H3N2, UIFMVZ613/H5N2 y UIFMVZ80/H5N2) y a los subtipos endémicos (Mex19/H1N1, Mex51/H3N2 y Mex52/H1N1). La granja con menor co-seropositividad fue la número 9 con detección de anticuerpos contra las variantes virales UIFMVZ322/H1N1, Mex19/H1N1, Mex51/H3N2 y Mex52/H1N1.

Cuadro 5. Co-seropositividad por granja.

N° SUBTIPOS	ESPECIE	GRANJA	N° ANIMALES	SUBTIPOS VIRALES (VARIANTES VIRALES)
6	Gallina	5,7	3	<u>H1N1</u> (Mex19 ,Mex 52, Lerma322) <u>H3N2</u> (Lerma465) y <u>H5N2</u> (Lerma377, Lerma613)
				<u>H1N1</u> (Lerma322), <u>H3N2</u> (Lerma465) y <u>H5N2</u> (Lerma377, Lerma613, Lerma80)
5	Gallina	5	4	<u>H1N1</u> (Mex19 ,Mex 52, Lerma322) <u>H3N2</u> (Mex51, Lerma465) y <u>H5N2</u> (Lerma377, Lerma613)
				<u>H1N1</u> (Mex19 ,Mex 52, Lerma322) <u>H3N2</u> (Mex51, Lerma465) y <u>H5N2</u> (Lerma377, Lerma613)
4	Gallina	3	2	<u>H1N1</u> (Mex19 ,Mex 52, Lerma322) <u>H3N2</u> (Mex51, Lerma465) y <u>H5N2</u> (Lerma613)
				<u>H1N1</u> (Mex19 ,Mex 52, Lerma322) <u>H3N2</u> (Lerma465) y <u>H5N2</u> (Lerma377, Lerma613)
4	Gallina	6	2	<u>H1N1</u> (Mex19 ,Mex 52, Lerma322) <u>H3N2</u> (Lerma465) y <u>H5N2</u> (Lerma377)
				<u>H1N1</u> (Mex19 ,Mex 52, Lerma322) y <u>H3N2</u> (Mex51, Lerma465)
4	Cerdo	2	2	<u>H1N1</u> (Mex19, Mex52, Lerma322) y <u>H3N2</u> (Lerma465)
				<u>H1N1</u> (Mex19 ,Mex 52, Lerma322) y <u>H3N2</u> (Mex51)
4	Cerdo	5	2	<u>H1N1</u> (Mex19, Mex52, Lerma322) y <u>H3N2</u> (Mex51, Lerma465)
				<u>H1N1</u> (Mex19, Mex52, Lerma322) y <u>H3N2</u> (Mex51)
4	Cerdo	9	1	<u>H1N1</u> (Mex19, Mex52, Lerma322) y <u>H3N2</u> (Mex51)
				<u>H1N1</u> (Mex19, Mex52, Lerma322) y <u>H3N2</u> (Mex51)

Otro punto es la seropositividad individual detectada en guajolotes y patos domésticos (Cuadro 6). En la mayoría de los guajolotes muestreados se detectaron anticuerpos contra la variante viral Mex19/H1N1 en las granjas N° 3 y 6, excepto un individuo que resultó seropositivo al virus UIFMVZ465/H3N2 ubicado en la granja N° 3. En los patos domésticos se obtuvo evidencia serológica para el VIA Mex19/H1N1 y co-seropositividad en dos animales con la variante viral Mex52/H1N1 provenientes de la granja N° 3. Mientras que el único individuo muestreado de la especie *Anser sp.* (Ganso común) presentó co-seropositividad con las variantes virales Mex19/H1N1, Mex52/H1N1 y UIFMVZ322/H1N1.

Cuadro 6. Seropositividad en otras especies de aves.

ESPECIE	VARIANTES VIRALES	TÍTULO DE ANTICUERPOS	GRANJA
Guajolote (<i>Meleagris gallopavo</i> var. <i>domesticus</i>)	A/swine/Mexico/Mex19/2010(H1N1)	1:16 hasta 1:128	3 y 6
	A/Green-winged_teal/Mexico/LermaUIFMVZ465/2016(H3N2)	1:16	3
Pato doméstico (<i>Cairina moschata domestica</i>)	A/swine/Mexico/Mex19/2010(H1N1)	1:16 hasta 1:64	3 y 6
	A/swine/Mexico/Mex52/2010(H1N1)	1:16	3
Ganso común (<i>Anser anser domesticus</i>)	A/swine/Mexico/Mex19/2010(H1N1)	1:128	6
	A/swine/Mexico/Mex52/2010(H1N1)	1:16	
	A/blue-winged_teal/Mexico/LermaUIFMVZ322/2016(H1N1)	1:32	

MODELO LINEAL GENERALIZADO

Con la información obtenida de las encuestas y los resultados de serología se realizó un Modelo Lineal Generalizado, teniendo como variable respuesta la seropositividad por granja, especie (cerdo o ave) y por subtipo viral. Las variables que explicaron de mejor manera la seroprevalencia de virus de Influenza por unidad de producción fueron el número de animales (NºA) y el destino de los mismos (DA). El modelo se especificó de la siguiente manera:

$$\text{Modelo: (POS, NEG) } \sim \text{N}^\circ\text{A} + \text{DA}$$

Este modelo tuvo una Pseudo-R² de 0.0368, por lo que la variabilidad de la respuesta se explica en un 3.68% y el valor obtenido del Criterio de Información de AIKAKE (AIC) fue de 1987.8. De todas las variables utilizadas para este análisis solo dos fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$): Número de animales (categorías 4,5 y 6) y destino de los animales (consumo familiar), mostrando así una relación positiva con la variable respuesta (Cuadro 7).

Cuadro 7. Resultados del Modelo Lineal Generalizado

VARIABLE EXPLICATIVA	VALOR ESTIMADO	P	PseudoR ²	AIC
NºA 4 (31-40 animales)	1.1337	0.0000204	0.0368	1987.8
NºA 5 (41-50 animales)	1.8774	0.0000595		
NºA 6 (>51 animales)	1.0573	0.01045		
DA (consumo familiar)	0.9522	0.00013		

P: Nivel de Significancia, AIC: Criterio de Información Aikake

DISCUSIÓN

El objetivo general del presente estudio fue la detección de la seropositividad hacia el virus de Influenza A en distintas granjas de traspatio dentro de un radio menor a 6 km de la Ciénega de Chignahuapan en Lerma, Estado de México. Además, conocer la relación existente entre la seroprevalencia y diversas características zootécnicas y de bioseguridad dentro de la interfaz aves silvestres-aves y cerdos de traspatio.

Entre los hallazgos principales destaca la co-seropositividad en gallinas (*Gallus gallus domesticus*), donde se encontraron anticuerpos contra los subtipos virales de origen porcino (Mex19/H1N1, Mex 52/H1N1) y los virus provenientes de los patos migratorios (UIFMVZ322/H1N1, UIFMVZ465/H3N2, UIFMVZ377/H5N2, UIFMVZ613/H5N2). Por otro lado, en cerdos la máxima detección de anticuerpos en un individuo fue de cuatro variantes virales de dos subtipos virales H1N1 (Mex19/H1N1, Mex52/H1N1, UIFMVZ322/H1N1) y H3N2 (Mex51/H3N2, UIFMVZ465/H3N2). La prueba diagnóstica de Inhibición de la Hemaglutinación (IH) es altamente específica y sensible, teniendo la propiedad de poder discernir entre subtipos virales a pesar de ser clasificados con la misma proteína de superficie como es la Hemaglutinina, en especial cuando existió una co-infección (22,88). En todas las producciones muestreadas se encontró diferencias en el título de anticuerpos entre subtipos similares (H1N1, H3N2 y H5N2) detectados en un mismo animal.

Sin embargo en algunas ocasiones puede existir un nivel bajo de cruzamiento antigénico, por lo que es necesario obtener sueros hiperinmunes para evaluar la relación antigénica entre virus para eliminar falsos positivos (22,88). Otra forma de evitar la presencia de falsos positivos, es elegir como positivo el aislado con mayor título de anticuerpos (89). En este último contexto y debido a la falta de antisueros para cada aislamiento viral, la determinación de seropositividad para el subtipo H1N1 en cerdos (1:1280) y aves (1:128), fue mayor con el virus de origen porcino

Mex19/H1N1 en la mayoría de las producciones. Solo en las granjas N° 2 y 3, se detectó un título de anticuerpos mayor contra el subtipo aislado de patos silvestres UIFMVZ322/H1N1 (1:320), a pesar de tener un 100% de similitud en su genoma con el subtipo Mex52/H1N1 en la proteína HA (79). Sin embargo, se han detectado cerca de 11 mutaciones en los aminoácidos que conforman la proteína neuraminidasa (NA) (79), lo que puede causar un cambio en la inhibición estérica causada por los anticuerpos (Ac) hacia la proteína NA y por lo tanto afectar la interacción de la proteína HA y los Ac dirigidos hacia ella (90). Por esta razón, es posible que la detección inmunológica a través de una prueba diagnóstica dirigida a la proteína HA, detectará una nueva variante viral del mismo subtipo viral.

Por otra parte, en las variantes virales del subtipo H3N2, el mayor título de anticuerpos se observó con el subtipo UIFMVZ465 en más de 60 individuos entre cerdos y aves (título de Ac 1:160 y 1:256 respectivamente). Mientras que, solamente 15 individuos, en su mayoría cerdos, ubicados en las granjas N° 5, 7 y 8 tuvieron una seropositividad alta con el subtipo Mex51/H3N2 (título de Ac 1:80 en cerdos y 1:256 en aves). Cabe destacar que esta mayor respuesta inmune de los animales de traspatio contra el VIA de origen silvestre (UIFMVZ465), coincidió en tiempo y espacio con la detección molecular en patos silvestres (79).

Lo mismo se observó con las variantes virales obtenidos de los patos con el subtipo viral H5N2, los cuales solo fueron detectados en gallinas, el virus UIFMVZ613/H5N2 obtuvo la mayor evidencia serológica con un título de anticuerpos de 1:16 a 1:256 en las granjas N° 1, 3, 5, 6, 7 y 8, en las cuáles los productores reportaron haber asistido a más de una vez al ANP donde se realiza la caza cinegética de aves silvestres. El subtipo UIFMVZ377/H5N2 presentó seropositividad solamente en tres granjas con un título máximo de anticuerpos de 1:256, este virus en particular se encuentra relacionado con VIA de aves silvestres de las rutas migratorias del Pacífico (Alaska y Utah) y del Mississippi (Arkansas) y fue detectada de una especie endémica: Pato Mexicano (*Anas platyrhynchos diazi*) (79). Por último, la variante viral UIFMVZ80/H5N2 solo presentó anticuerpos

en tres individuos (1:32) localizados en las granjas 3, 6 y 7. Las variantes virales UIFMVZ613/H5N2 y UIFMVZ80/H5N2 presentan un 100% de similitud con el subtipo GtoDMZC02/H5N2 de origen porcino, sin embargo se identificaron mutaciones de aminoácidos en la proteína HA entre ambas variantes virales (Mutación K1272N (Lisina → Asparagina) (79). De manera que, la presencia de los diferentes aislamientos virales del subtipo (H5N2), no presentaron antigenicidad cruzada entre si ante la prueba serológica de IH, confirmando que se tratan de variantes virales diferentes.

Otro hallazgo importante, fue la baja seropositividad en los patos domésticos muestreados (*Cairina moschata domestica*), los cuales solo presentaron anticuerpos contra el subtipo H1N1 de origen porcino (Mex19/H1N1) con un título de 1:64. Asimismo, el único individuo muestreado de la especie *Anser anser domesticus* (Ganso común), resultó positivo serológicamente a las tres variantes virales del subtipo H1N1 presentando títulos de anticuerpos diferentes, de los cuales, el de origen porcino presentó un título mayor (Mex19/H1N1 - 1:128). Sumado a esto, no se encontró evidencia serológica de la co-circulación de los subtipos H1N1, H3N2 y H5N2 entre estas especies, a pesar de detectarse la co-seropositividad en gallinas que conviven en el mismo sitio (Granjas N° 3 y 6). La presencia del VIA de origen porcino en patos y gansos domésticos es poco reportada, sin embargo existen estudios donde se ha identificado la presencia del virus porcinos como H5N1 y H7N1 VIAAP en estas especies aviares y bajo sistemas de producción de traspatio que convergen con humedales (91,92).

Adicionalmente, las seroprevalencias generales obtenidas contra los subtipos de origen porcino fue de 69.75% para el subtipo viral Mex19/H1N1, 9.75 % para Mex51/H3N2 y 45.82% para Mex52/H1N1 en porcinos. Estos resultados coinciden con lo reportado en el Estado de México y la zona del Bajío para el subtipo H1N1 45.7% y 55% y el subtipo H3N2 (33.33%) en cerdos dentro de producciones semi-tecnificadas y de traspatio (60,70,93). La ausencia de anticuerpos contra el subtipo H5N2 de origen porcino coincide con lo investigado en un trabajo experimental

realizado en la FMVZ en el año 2017, donde se realizó una inoculación del virus H5N2 en cerdos resultando en un bajo título de anticuerpos (<1:80) (94). La inmunidad dada por los subtipos porcinos H1N1 y H3N2 genera una barrera para la infección de subtipos de origen aviar (95), por lo cual es posible que en este estudio no se encontrará respuesta inmunitaria por parte de los subtipos H5N2 en porcinos.

En aves domésticas, la seropositividad fue mayor en comparación de las frecuencias obtenidas en cerdos, 81.93% para Mex19/H1N1, 25.68% para Mex51/H3N2 y 62.43% para el subtipo Mex52/H1N1. La mayoría de las infecciones en aves de corral son causadas por el VIA de origen aviar, sin embargo, se han localizado receptores de ácido siálico para virus de origen porcino (α -2,3 galactosa) en tracto respiratorio e intestino (31). Los reportes de subtipos de origen porcino en aves son escasos, no obstante, los VIAPo H1N1, H1N2 y H3N2 se han detectado en pavos (*Meleagris gallopavo*) causando una disminución en la producción de huevo (96–99). En nuestro estudio, se encontraron cuatro granjas (Nº 2, 3, 6, 8) con presencia de guajolotes (*Meleagris gallopavo var. domesticus*), en las cuales se encontró seropositividad arriba del 40% para los aislados virales del subtipo H1N1 y mayor del 30% para el subtipo H3N2.

La seropositividad de los subtipos virales aislados en patos migratorios fue de 60.78% y 28.99% para los subtipos H1N1 y H3N2 en cerdos de traspatio y 62.43% y 37.95% en aves de corral. Los aislados virales utilizados tienen origen porcino y aviar que circulan en granjas en el Estado de México, Guanajuato, Hidalgo, Michoacán y Querétaro desde el año 2010 y 2014 (79). En este sentido, la presencia de VIAPo en aves silvestres es poco documentado, sin embargo Olsen *et al* (2003) reportaron un aislamiento viral H1N2 en patos silvestres relacionados a un rearreglo porcino, aviar y humano (H1N1) y con el virus H3N2 presente en porcinos en Carolina del Norte, Estados Unidos (100). Igualmente en China existen reportes de la presencia de un subtipo H3N2 en patos con segmentos de

origen porcino del virus H3N2 y H1N1 (101). Ambos rearrreglos virales presentan identidades mayores del 98% con los subtipos de origen porcino, lo cual concuerda con lo obtenido en la filogenia de los subtipos UIFMVZ322/H1N1 y UIFMVZ465/H3N2 (99%) (79). Sumado a esto, la diferencia en la detección de anticuerpos contra más de un subtipo viral (H1N1 y H3N2 de origen porcino o aviar), podría indicar la existencia de nuevas variantes virales y la nula o poca existencia de antigenicidad cruzada a través de la prueba de IH.

Desde otra perspectiva, la inclusión del Modelo Lineal Generalizado (GLM) fue una aproximación pobre para conocer la relación entre las variables descritas por granja y la presencia de animales positivos al VIA. Esto debido a que el análisis solo pudo describir alrededor del 4% la variable respuesta, a pesar de ello, se encontraron dos características estadísticamente significativas: el número de animales (N^oA) y el destino de los mismos (DA), las cuales mostraron una relación positiva con la seroprevalencia de VIA.

El número de animales mostró una relación positiva con la seropositividad del virus, siendo mayor al presentarse una población arriba de 31 animales. Esto es debido al aumento en la tasa de contacto entre individuos, facilitando la transmisión del VIA por contacto directo (43). Por otra parte, el destino de los animales también fue estadísticamente significativa con una relación positiva solamente para la categoría N^o 2: autoconsumo de los animales. La mayoría de los sistemas productivos de traspatio se realizan bajo un esquema de baja bioseguridad y poco manejo zootécnico, siendo la principal fuente de alimentos para la familia propietaria (46,49). Debido a estos factores donde se genera un flujo de animales y productos dentro del hogar sin ninguna vigilancia, las granjas de traspatio se consideran zonas de alto riesgo para la emergencia de infecciones zoonóticas (102).

Si bien, al analizar el resto de las variables para identificar factores de riesgo para la presencia de anticuerpos contra VIA, no se observó alguna otra

asociación. Esto podría ser explicado por la poca variabilidad de las condiciones de manejo y bioseguridad observadas en las granjas (47). Sin embargo, las condiciones con las que se realiza el manejo con los animales dentro de cada granja, reflejan una alta probabilidad de contacto entre animales domésticos, aves silvestres y humanos. Por ejemplo, las granjas con mayor co-seropositividad fueron localizadas a menos de 4 km del centroide de la Ciénega de Chignahuapan, asimismo se obtuvo una seropositividad del subtipo viral silvestre UIFMVZ377/H5N2 solo en las granjas 3, 5, 7; dos de las cuales se encontraban a menos de 2 km del humedal, mientras que la otra granja fue localizada a 5.67 km. Se ha reportado que la presencia de cuerpos de agua cercanas a producciones favorecen la circulación del VIA debido a la contaminación de agua con heces de aves (103). Esto se ha evidenciado en China con los subtipos H7N9 y H10N8 con segmentos silvestres en aves domésticas (104). En el caso, de la producción que se encontraba más lejana a la Ciénega, la introducción del virus pudo darse a través de fómites o por la compra de animales infectados con el VIA (27).

Igualmente, podemos relacionar los resultados obtenidos por el GLM al tipo de muestreo realizado (oportunista) que generó una cantidad pequeña de muestras por producción de traspatio. No obstante, los resultados de seropositividad confirman la existencia de los subtipos endémicos de origen porcino reportados con anterioridad en el Estado de México, además de la posible circulación de subtipos silvestres en cerdos y aves de traspatio, debido a la poca o nula bioseguridad presente en las granjas y en la zona de cacería en el Área Natural Protegida. Estos antecedentes obtenidos en la interfaz, dan lugar a escenarios para el surgimiento de nuevas variantes virales (47,102) y la necesidad de ampliar la recolección de muestras en número y espaciotemporalmente para futuros análisis, además la inclusión de otras variables para caracterizar cada una de las unidades de producción muestreadas para comprender la dinámica de transmisión de los virus de Influenza en la región.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos a través de la prueba de IH en este estudio demostraron la evidencia serológica contra los subtipos virales porcinos que se encuentran circulando desde 2010 en cerdos (H1N1, H3N2), sumado a esto se encontraron títulos de anticuerpos altos contra los mismos virus en aves domésticas. Por otro lado, durante la temporada invernal 2016-2017 en la Ciénega de Chignahuapan se encontraron patos migratorios positivos a virus de Influenza (H1N1, H3N2), además de un pato residente positivo al subtipo H5N2. Estos animales coinciden espacio temporalmente con la seropositividad detectada dentro de las granjas de traspatio muestreadas localizadas a menos de 6 km del centroide del humedal, lo que sugiere la transmisión de estos virus hacia animales domésticos.

A pesar de no encontrar un porcentaje alto para la explicación de la seropositividad en las granjas a través del GLM, se identificaron factores importantes que pueden afectar la dinámica de transmisión del virus de Influenza en la región, como es la densidad de animales, el destino de los mismos y la cercanía a la Ciénega. Estas variables permiten el aumento en la tasa de contacto entre aves silvestres-cerdos y aves de traspatio con la posibilidad de aumentar la transmisión por contacto directo o mediante fómites o agua contaminada. Por esta razón, se recomienda continuar con el estudio en unidades de producción con sistemas de traspatio debido a los bajos niveles de bioseguridad que presentan. Asimismo, se evidencia la necesidad de estudiar la interfaz entre animales domésticos y silvestres para determinar puntos clave relacionados con la transmisión y el control de las enfermedades infecciosas ya que constituyen un riesgo latente para la producción y sanidad animal, así como para la salud pública.

ABREVIATURAS

AICAS	Área de Importancia para la Conservación de Aves Silvestres
ANP	Área Natural Protegida
B	Bioseguridad
C	Contacto entre aves y cerdos
D	Distancia a la Ciénega
DA	Destino de animales
DEFSAL	Departamento de Etología, Fauna Silvestre y Animales de Laboratorio
DMZC	Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EP	Embrión de pollo
FMVZ	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
GLM	Modelo Lineal Generalizado
HA	Hemaglutinina
IH	Inhibición de la hemaglutinación
IN	Inhibición de la neuraminidasa
M1	Proteína de matriz 1
M2	Proteína de matriz 2
NA	Neuraminidasa
NEP	Proteína exportadora nuclear
NºA	Número de animales
NP	Nucleoproteína
NS1	Proteína no estructural 1
NS2	Proteína no estructural 2
PA	Polimerasa ácido
PAA	Presencia de aves acuáticas
PB1	Polimerasa básica 1
PB2	Polimerasa básica 2
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos
PFS	Presencia de fauna silvestre

RPM	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcripción Reversa
TG	Tipo de granja
UHA	Unidades Hemaglutinantes
UI	Unidad de Investigación
VIA	Virus de Influenza A
VIAAP	Virus de Influenza A de Alta Patogenicidad
VIABP	Virus de Influenza A de Baja Patogenicidad
VIAPo	Virus de Influenza Porcina
VIAv	Virus de Influenza Aviar

ANEXOS

ANEXO 1. Fechas de obtención de muestreos

GRANJA	FECHAS	MUESTRAS
1.	03-12-16	A= 4, C= 9
2.	18-12-16 / 12-02-17 / 19-02-17	A= 4, C= 37
3.	12-03-17	A= 18
4.	25-03-17	A= 6, C= 12
5.	13-05-17	A= 13, C= 16
6.	06-05-17	A= 8, C= 11
7.	06-05-17	A= 14
8.	27-05-17	A=13, C=15
9.	23-04-17	C= 20

A= aves, C= cerdos

ANEXO 2. Porcentaje de seroprevalencia por especie y subtipo viral.

ESPECIE	SUBTIPO	SEROPREVALENCIA %
Ave	Mex19/H1N1	81.93
	Mex51/H3N2	25.68
	Mex52/H1N1	62.43
	LermaUIFMVZ377/H5N2	7.5
	LermaUIFMVZ80/H5N2	4.42
	LermaUIFMVZ613/H5N2	36.75
	LermaUIFMVZ465/H3N2	37.95
	LermaUIFMVZ322/H1N1	62.18
Cerdos	Mex19/H1N1	69.75
	Mex51/H3N2	9.52
	Mex52/H1N1	45.82
	LermaUIFMVZ465/H3N2	28.99
	LermaUIFMVZ322/H1N1	60.78

Los subtipos marcados de color verde, fueron aislados de aves silvestres.

ANEXO 3. Porcentaje de seroprevalencia por unidad de producción y subtipo viral.

GRANJA	SUBTIPO	SEROPREVALENCIA %
1.	Mex19/H1N1	100
	Mex51/H3N2	0
	Mex52/H1N1	21.51
	LermaUIFMVZ377/H5N2	0
	LermaUIFMVZ80/H5N2	0
	LermaUIFMVZ613/H5N2	58.65
	LermaUIFMVZ465/H3N2	17.92
	LermaUIFMVZ322/H1N1	58.65
2.	Mex19/H1N1	71.68
	Mex51/H3N2	0
	Mex52/H1N1	28.30
	LermaUIFMVZ377/H5N2	0
	LermaUIFMVZ80/H5N2	0
	LermaUIFMVZ613/H5N2	0
	LermaUIFMVZ465/H3N2	47.21
	LermaUIFMVZ322/H1N1	73.43
3.	Mex19/H1N1	98.57
	Mex51/H3N2	0
	Mex52/H1N1	26.88
	LermaUIFMVZ377/H5N2	5.97
	LermaUIFMVZ80/H5N2	7.68
	LermaUIFMVZ613/H5N2	33.60
	LermaUIFMVZ465/H3N2	23.89
	LermaUIFMVZ322/H1N1	41.82
4.	Mex19/H1N1	100
	Mex51/H3N2	6.33
	Mex52/H1N1	69.58
	LermaUIFMVZ377/H5N2	0

	LermaUIFMVZ80/H5N2	0
	LermaUIFMVZ613/H5N2	0
	LermaUIFMVZ465/H3N2	5.97
	LermaUIFMVZ322/H1N1	83.63
5.	Mex19/H1N1	51.77
	Mex51/H3N2	46.08
	Mex52/H1N1	87.61
	LermaUIFMVZ377/H5N2	3.71
	LermaUIFMVZ80/H5N2	0
	LermaUIFMVZ613/H5N2	29.66
	LermaUIFMVZ465/H3N2	74.16
	LermaUIFMVZ322/H1N1	81.57
6.	Mex19/H1N1	65.71
	Mex51/H3N2	5.97
	Mex52/H1N1	41.82
	LermaUIFMVZ377/H5N2	0
	LermaUIFMVZ80/H5N2	6.33
	LermaUIFMVZ613/H5N2	11.95
	LermaUIFMVZ465/H3N2	16.98
	LermaUIFMVZ322/H1N1	33.96
7.	Mex19/H1N1	100
	Mex51/H3N2	53.76
	Mex52/H1N1	100
	LermaUIFMVZ377/H5N2	30.72
	LermaUIFMVZ80/H5N2	7.68
	LermaUIFMVZ613/H5N2	38.40
	LermaUIFMVZ465/H3N2	61.44
	LermaUIFMVZ322/H1N1	92.17
8.	Mex19/H1N1	53.76
	Mex51/H3N2	11.52

	Mex52/H1N1	34.56
	LermaUIFMVZ377/H5N2	0
	LermaUIFMVZ80/H5N2	0
	LermaUIFMVZ613/H5N2	3.84
	LermaUIFMVZ465/H3N2	18.54
	LermaUIFMVZ322/H1N1	30.72
9.	Mex19/H1N1	80.65
	Mex51/H3N2	16.13
	Mex52/H1N1	53.76
	LermaUIFMVZ377/H5N2	0
	LermaUIFMVZ80/H5N2	0
	LermaUIFMVZ613/H5N2	0
	LermaUIFMVZ465/H3N2	0
	LermaUIFMVZ322/H1N1	53.76

Los subtipos marcados de color verde, fueron asilados de aves silvestres.

ANEXO 4. Porcentajes de Seroprevalencia por granja, especie y quasiespecie de VIA.

GRANJA	ESPECIE	VIRUS	% PREVALENCIA
1.	Aves	Mex19/H1N1	100
		Mex51/H3N2	0
		Mex52/H1N1	0
		LermaUIFMVZ377/H5N2	0
		LermaUIFMVZ80/H5N2	0
		LermaUIFMVZ613/H5N2	92.17
		LermaUIFMVZ465/H3N2	13.44
		LermaUIFMVZ322/H1N1	30.72
	Cerdos	Mex19/H1N1	100
		Mex51/H3N2	0
Mex52/H1N1		26.88	
LermaUIFMVZ465/H3N2		26.88	
LermaUIFMVZ322/H1N1		100	
2.	Aves	Mex19/H1N1	100
		Mex51/H3N2	0
		Mex52/H1N1	0
		LermaUIFMVZ377/H5N2	0
		LermaUIFMVZ80/H5N2	0
		LermaUIFMVZ613/H5N2	0
		LermaUIFMVZ465/H3N2	0
		LermaUIFMVZ322/H1N1	53.76
	Cerdos	Mex19/H1N1	69.58
		Mex51/H3N2	0
		Mex52/H1N1	29.96
		LermaUIFMVZ465/H3N2	52.31
		LermaUIFMVZ322/H1N1	75.56

3.	Aves	Mex19/H1N1	98.57
		Mex51/H3N2	0
		Mex52/H1N1	26.88
		LermaUIFMVZ377/H5N2	5.97
		LermaUIFMVZ80/H5N2	7.68
		LermaUIFMVZ613/H5N2	33.60
		LermaUIFMVZ465/H3N2	23.89
		LermaUIFMVZ322/H1N1	41.82
4.	Aves	Mex19/H1N1	100
		Mex51/H3N2	0
		Mex52/H1N1	64.52
		LermaUIFMVZ377/H5N2	0
		LermaUIFMVZ80/H5N2	0
		LermaUIFMVZ613/H5N2	0
		LermaUIFMVZ465/H3N2	17.92
		LermaUIFMVZ322/H1N1	89.61
	Cerdos	Mex19/H1N1	98.57
		Mex51/H3N2	8.96
		Mex52/H1N1	71.68
		LermaUIFMVZ465/H3N2	0
		LermaUIFMVZ322/H1N1	80.65
5.	Aves	Mex19/H1N1	58.65
		Mex51/H3N2	80.65
		Mex52/H1N1	100
		LermaUIFMVZ377/H5N2	8.27
		LermaUIFMVZ80/H5N2	0
		LermaUIFMVZ613/H5N2	66.17
		LermaUIFMVZ465/H3N2	66.17
		LermaUIFMVZ322/H1N1	74.44
	Cerdos	Mex19/H1N1	47.04

		Mex51/H3N2	20.16
		Mex52/H1N1	73.92
		LermaUIFMVZ465/H3N2	80.65
		LermaUIFMVZ322/H1N1	87.37
6.	Aves	Mex19/H1N1	92.17
		Mex51/H3N2	0
		Mex52/H1N1	46.08
		LermaUIFMVZ377/H5N2	0
		LermaUIFMVZ80/H5N2	17.92
		LermaUIFMVZ613/H5N2	30.72
		LermaUIFMVZ465/H3N2	40.32
		LermaUIFMVZ322/H1N1	67.20
	Cerdos	Mex19/H1N1	48.88
		Mex51/H3N2	9.78
		Mex52/H1N1	39.10
		LermaUIFMVZ465/H3N2	0
		LermaUIFMVZ322/H1N1	9.78
7.	Aves	Mex19/H1N1	100
		Mex51/H3N2	53.76
		Mex52/H1N1	100
		LermaUIFMVZ377/H5N2	30.72
		LermaUIFMVZ80/H5N2	7.68
		LermaUIFMVZ613/H5N2	38.40
		LermaUIFMVZ465/H3N2	61.44
		LermaUIFMVZ322/H1N1	92.17
8.	Aves	Mex19/H1N1	41.36
		Mex51/H3N2	8.27
		Mex52/H1N1	33.09
		LermaUIFMVZ377/H5N2	0
		LermaUIFMVZ80/H5N2	0

		LermaUIFMVZ613/H5N2	8.27
		LermaUIFMVZ465/H3N2	38.40
		LermaUIFMVZ322/H1N1	49.63
	Cerdos	Mex19/H1N1	64.52
		Mex51/H3N2	14.34
		Mex52/H1N1	35.84
		LermaUIFMVZ465/H3N2	0
		LermaUIFMVZ322/H1N1	14.34
	9.	Cerdos	Mex19/H1N1
Mex51/H3N2			16.13
Mex52/H1N1			53.76
LermaUIFMVZ465/H3N2			0
LermaUIFMVZ322/H1N1			53.76

Los subtipos marcados de color verde, fueron aislados de aves silvestres.

REFERENCIAS

1. Taylor LH, Latham SM, Woolhouse MEJ. Risk factors for human disease emergence. *R Soc.* 2001;326:983–9.
2. Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, et al. Global trends in emerging infectious diseases. 2008;451(February):990–4.
3. Newcomb J, Harrington T, Aldrich S. The economic impact of selected infectious disease outbreaks. Bio Economic Research Associates. 2011;
4. Van Reeth K, Annebel D, Constantinos K, Pensaert M. Influenza in birds, pigs and humans old theories versus current viewpoints. In: Proceedings of the 19th IPVS Congress [Internet]. Copenhagen, Denmark; 2006. p. 26–33. Available from: <http://www.ivis.org/proceedings/ipvs/2006/KEYNOTE/Reeth.pdf?..>
5. Taubenberger JK, Morens DM. Influenza: the once and future pandemic. *Public Health Rep* [Internet]. 2010;125 Suppl:16–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20568566%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2862331>
6. Aparicio MÁ, Delgado G. México: la economía antes y después de la influenza. 2009;185–9.
7. Maclachlan N, Dubovi E. Orthomyxoviridae. In: Dubovi EJ, editor. *Fenner's Veterinary Virology* [Internet]. San Diego: Elsevier; 2017. p. 389–410. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128009468000210>
8. Neumann G, Kawaoka Y. Transmission of influenza A viruses. *Virology.* 2015;479–480:234–46.
9. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM. Evolution and Ecology of Influenza A Viruses. 1992;56(1):152–79.
10. Medina RA, Garcia-Sastre A. Influenza A viruses: new research developments. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2011;9(8):590–603. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21747392>
11. FAO, OIE, WHO. Influenza and other emerging zoonotic diseases at the human-animal interface. Vol. 13, Proceedings of the FAO/OIE/WHO Joint

- Scientific Consultation. 2011.
12. (ICTV) IC on T of V. Orthomyxoviridae [Internet]. 2018 [cited 2018 Dec 27]. Available from: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>
 13. Córdoba V, Valdespin G, Ponce de León R. La Epidemia de influenza A/H1N1 en México. México: Editorial Médica Panamericana; 2010.
 14. Hause B, Collin E, Liu R, Huang B, Sheng Z, Lu W. Characterization of a novel influenza virus strain in cattle and swine: proposal for a new genus in the Orthomyxoviridae family. *MBio* [Internet]. 2014;5(2):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00031-14>
 15. Rezza G, Ippolito G. Emerging and Re-emerging Viral Infections: Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health [Internet]. Springer International Publishing; 2017. (Advances in Experimental Medicine and Biology). Available from: <https://books.google.com.mx/books?id=68rbDgAAQBAJ>
 16. Munoz O, De Nardi M, Van Der Meulen K, Van Reeth K, Koopmans M, Harris K, et al. Genetic adaptation of influenza A viruses in domestic animals and their potential role in interspecies transmission: A literature review. *Ecohealth*. 2016;13(1):171–98.
 17. Gramer M. Defining swine influenza virus. *J Swine Heal Prod* [Internet]. 2005 May 1 [cited 2018 Dec 27];13(3):157–60. Available from: <https://www.aasv.org/shap/issues/v13n3/v13n3p157.html>
 18. Barrera A, García T, Tapia K, Medina RA. Factores virales e inmunológicos del hospedero que afectan a la gravedad de la infección por virus de Influenza. *Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular*. 2016;13–9.
 19. Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, et al. New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses. *PLoS Pathog*. 2013;9(10).
 20. Pauly MD, Procaro MC, Lauring AS. A novel twelve class fluctuation test reveals higher than expected mutation rates for influenza A viruses. *Elife*. 2017;6:1–18.
 21. Brown IH. The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs. *Vet*

- Microbiol. 2000;74(1–2):29–46.
22. Gaitán-Peredo C. Análisis serológico retrospectivo del virus de Influenza porcina subtipo H1N2 en los últimos seis años (2010-2015) en la República Mexicana. Universidad Nacional Autónoma de México; 2016.
 23. Taubenberger JK, Baltimore D, Doherty PC, Markel H, Morens DM, Webster RG, et al. Reconstruction of the 1918 Influenza Virus: Unexpected Rewards from the Past. *MBio* [Internet]. 2012 Sep 11;3(5):1–5. Available from: <http://mbio.asm.org/cgi/doi/10.1128/mBio.00201-12>
 24. Kilbourne ED. Influenza pandemics of the 20th century. *Emerg Infect Dis*. 2006;12(1):9–14.
 25. Smith GJD, Bahl J, Vijaykrishna D, Zhang J, Poon LLM, Chen H, et al. Dating the emergence of pandemic influenza viruses. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2009;106(28):11709–12. Available from: <http://www.pnas.org/lookup/doi/10.1073/pnas.0904991106>
 26. Sandham JD, Hull RD, Brant RF, Ph D, Knox L, Pineo GF, et al. Emergence of a Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus in Humans. *N Engl J Med* [Internet]. 2009 Jun 18;360(25):2605–15. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0903810>
 27. Joseph U, Su YCF, Vijaykrishna D, Smith GJD. The ecology and adaptive evolution of influenza A interspecies transmission. *Influenza Other Respi Viruses*. 2017;11(1):74–84.
 28. Sawabe K, Hoshino K, Isawa H, Sasaki T, Hayashi T, Tsuda Y, et al. Detection and isolation of highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses from blow flies collected in the vicinity of an infected poultry farm in Kyoto, Japan, 2004. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2006 Aug;75(2):327–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16896143>
 29. Barbazan P, Thitithanyanont A, Missé D, Dubot A, Bosc P, Luangsri N, et al. Detection of H5N1 Avian Influenza Virus from Mosquitoes Collected in an Infected Poultry Farm in Thailand. *Vector-Borne Zoonotic Dis* [Internet]. 2008;8(1):105–10. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/vbz.2007.0142>

30. De Graaf M, Fouchier RAM. Role of receptor binding specificity in influenza A virus transmission and pathogenesis. *EMBO J.* 2014;33(8):823–41.
31. Pillai SPS, Lee CW. Species and age related differences in the type and distribution of influenza virus receptors in different tissues of chickens, ducks and turkeys. *Virology J.* 2010;7:1–8.
32. Van Poucke SG, Nicholls JM, Nauwynck HJ, Van Reeth K. Replication of avian, human and swine influenza viruses in porcine respiratory explants and association with sialic acid distribution. *Virology J* [Internet]. 2010;7:38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20158900>
33. Jourdain E, van Riel D, Munster VJ, Kuiken T, Waldenström J, Olsen B, et al. The pattern of influenza virus attachment varies among wild bird species. *PLoS One.* 2011;6(9):4–7.
34. Nelli RK, Kuchipudi S V, White GA, Perez B, Dunham SP, Chang K-C. Comparative distribution of human and avian type sialic acid influenza receptors in the pig. *BMC Vet Res* [Internet]. 2010;6(1):4. Available from: <http://bmcvetres.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-6148-6-4>
35. Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. 2001;78:103–16.
36. Zhou L, Liao Q, Dong L, Huai Y, Bai T, Xiang N, et al. Risk Factors for Human Illness with Avian Influenza A (H5N1) Virus Infection in China. 2009;199.
37. Ostfeld RS, Keesing F, Eviner VT. *Infectious Disease Ecology. The effects of ecosystems on disease and of disease on ecosystems.* [Internet]. Princeton. Ostfeld RS, Keesing F, Eviner VT, editors. EUA: Princeton University Press; 2008. Available from: <https://www.degruyter.com/view/books/9781400837885/9781400837885/9781400837885.xml>
38. Nelson MI, Wentworth DE, Culhane MR, Vincent AL, Viboud C, LaPointe MP, et al. Introductions and Evolution of Human-Origin Seasonal Influenza A Viruses in Multinational Swine Populations. *J Virol* [Internet]. 2014;88(17):10110–9. Available from:

- <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.01080-14>
39. Hassell JM, Begon M, Ward MJ, Fèvre EM. Urbanization and Disease Emergence: Dynamics at the Wildlife–Livestock–Human Interface. *Trends Ecol Evol* [Internet]. 2017;32(1):55–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tree.2016.09.012>
 40. Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, Waldenström J, Osterhaus ADME, Fouchier RAM. Global Patterns of Influenza A Virus in Wild Birds. *Science* (80-) [Internet]. 2006;312(5772):384–8. Available from: <http://www.sciencemag.org/content/312/5772/384.abstract>
 41. Dalziel AE, Delean S, Heinrich S, Cassey P. Persistence of low pathogenic influenza A virus in water: A systematic review and quantitative meta-analysis. *PLoS One*. 2016;11(10).
 42. Runstadler J, Hill N, Hussein ITM, Puryear W, Keogh M. Connecting the study of wild influenza with the potential for pandemic disease. *Infect Genet Evol* [Internet]. 2013;17:162–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.02.020>
 43. Beldomenico PM, Uhart M. Ecoepidemiología de los Virus de Influenza Aviar. *Rev FAVE- CsVet* [Internet]. 2008 Feb 10;7(1/2):23–40. Available from: <http://bibliotecavirtual.unl.edu.ar/publicaciones/index.php/FAVEveterinaria/article/view/1467>
 44. Webster RG, Hulse DJ. Microbial adaptation and change: avian influenza. *Rev Sci Tech* [Internet]. 2004;23(2):453–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15702713>
 45. Foley J a, Defries R, Asner GP, Barford C, Bonan G, Carpenter SR, et al. Global consequences of land use. *Science* [Internet]. 2005;309(5734):570–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16040698>
 46. Vieyra J, Castillo A, Losada H, Cortés J, Alonso G, Ruiz T, et al. La participación de la mujer en la producción traspatio y sus beneficios tangibles e intangibles. *Cuad Desarro Rural* [Internet]. 2004;53(53):9–23. Available from:

http://www.javeriana.edu.co/ier/recursos_user/IER/documentos/revista53/participacion_1.pdf

47. Bravo-Vasquez N, Di Pillo F, Lazo A, Jiménez-Bluhm P, Schultz-Cherry S, Hamilton-West C. Presence of influenza viruses in backyard poultry and swine in El Yali wetland, Chile. *Prev Vet Med* [Internet]. 2016 Nov;134:211–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.10.004>
48. Zhao L, Niu Y, Lu T, Yin H, Zhang Y, Xu L, et al. Metagenomic Analysis of the Jinding Duck Fecal Virome. *Curr Microbiol* [Internet]. 2018;75(6):658–65. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00284-018-1430-3>
49. Gutiérrez-Ruiz, E. J.; Aranda, C.F.J.; Rodríguez, V.R.I; Bolio, G.M.E.; Ramírez, G.S. y Estrella TJ. Factores sociales de la crianza de animales de traspatio en Yucatán, México. *Bioagrocencias*. 2012;5(1):20–8.
50. Couillard M, Petric M, Mazzulli T, Boivin G. Diagnosis of Viral Infections. In: *Clinical Virology, Third Edition* [Internet]. Washington, DC: American Society of Microbiology; 2009. p. 265–94. Available from: <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555815981.ch13>
51. Pedersen JC. Hemagglutination-Inhibition Assay for Influenza Virus Subtype Identification and the Detection and Quantitation of Serum Antibodies to Influenza Virus. In 2014. p. 11–25. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-0758-8_2
52. Pedersen JC. Neuraminidase-Inhibition Assay for the Identification of Influenza A Virus Neuraminidase Virus Subtype or Neuraminidase Antibody Specificity. In 2014. p. 27–36. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-0758-8_3
53. Gauger PC, Loving CL, Vincent AL. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection of Serum or Mucosal Isotype-Specific IgG and IgA Whole-Virus Antibody to Influenza A Virus in Swine. In 2014. p. 303–12. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-0758-8_25
54. Hurt AC, Fouchier RAM, Vijaykrishna D. Ecology and Evolution of Avian Influenza Viruses. *Genet Evol Infect Dis Second Ed*. 2017;621–40.
55. Alexander DJ. An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine*.

- 2007;25(30 SPEC. ISS.):5637–44.
56. (OIE) World Organization for Animal Health. OIE Situation Report for Highly Pathogenic Avian Influenza [Internet]. 2018 [cited 2019 Jan 17]. Available from:
http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/OIE_AI_situation_report/OIE_SituationReport_AI_August2018.pdf
 57. Kitikoon P, Vincent AL, Gauger PC, Schlink SN, Bayles DO, Gramer MR, et al. Pathogenicity and Transmission in Pigs of the Novel A(H3N2)v Influenza Virus Isolated from Humans and Characterization of Swine H3N2 Viruses Isolated in 2010-2011. *J Virol* [Internet]. 2012;86(12):6804–14. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.00197-12>
 58. Balzli C, Lager K, Vincent A, Gauger P, Brockmeier S, Miller L, et al. Susceptibility of swine to H5 and H7 low pathogenic avian influenza viruses. *Influenza Other Respi Viruses*. 2016;10(4):346–52.
 59. Peiris JSM, Guan Y, Markwell D, Ghose P, Webster RG, Shortridge KF. Cocirculation of Avian H9N2 and Contemporary “Human” H3N2 Influenza A Viruses in Pigs in Southeastern China: Potential for Genetic Reassortment? *J Virol* [Internet]. 2001 Oct 15;75(20):9679–86. Available from: https://www.researchgate.net/publication/253360285_Stable_Chromium_Isotopes_as_tracer_of_changes_in_weathering_processes_and_redox_state_of_the_ocean_during_Neoproterozoic_glaciation
 60. Sánchez-Betancourt JI, Cervantes-Torres JB, Saavedra-Montañez M, Segura-Velázquez RA. Complete genome sequence of a novel influenza A H1N2 virus circulating in swine from Central Bajío region, Mexico. *Transbound Emerg Dis*. 2017;64(6):2083–92.
 61. De Vleeschauwer A, Van Poucke S, Braeckmans D, Van Doorselaere J, Van Reeth K. Efficient Transmission of Swine-Adapted but Not Wholly Avian Influenza Viruses among Pigs and from Pigs to Ferrets. *J Infect Dis* [Internet]. 2009;200(12):1884–92. Available from: <https://academic.oup.com/jid/article-lookup/doi/10.1086/648475>
 62. Baudon E, Peyre M, Peiris M, Cowling BJ. Epidemiological features of

- influenza circulation in swine populations: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2017;12(6):1–25.
63. Hulse-Post DJ, Sturm-Ramirez KM, Humberd J, Seiler P, Govorkova EA, Krauss S, et al. Role of domestic ducks in the propagation and biological evolution of highly pathogenic H5N1 influenza viruses in Asia. *Proc Natl Acad Sci [Internet]*. 2005 Jul 26;102(30):10682–7. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0504662102>
 64. Sturm-Ramirez KM, Hulse-Post DJ, Govorkova EA, Humberd J, Seiler P, Puthavathana P, et al. Are Ducks Contributing to the Endemicity of Highly Pathogenic H5N1 Influenza Virus in Asia? *J Virol [Internet]*. 2005 Sep 1;79(17):11269–79. Available from: <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.79.17.11269-11279.2005>
 65. Pepin KM, Wang J, Webb CT, Smith GJD, Poss M, Hudson PJ, et al. Multiannual patterns of influenza A transmission in Chinese live bird market systems. *Influenza Other Respi Viruses*. 2013;7(1):97–107.
 66. Abente EJ, Gauger PC, Walia RR, Rajao DS, Zhang J, Harmon KM, et al. Detection and characterization of an H4N6 avian-lineage influenza A virus in pigs in the Midwestern United States. *Virology [Internet]*. 2017 Nov;511:56–65. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042682217302854>
 67. Verhagen JH, Lexmond P, Vuong O, Schutten M, Guldemeester J, Osterhaus ADME, et al. Discordant detection of avian influenza virus subtypes in time and space between poultry and wild birds; Towards improvement of surveillance programs. Vol. 12, *PLoS ONE*. 2017.
 68. Netrabukkana P, Robertson ID, Kasemsuwan S, Wongsathapornchai K, Fenwick S. Assessing Potential Risks of Influenza A Virus Transmission at the Pig-Human Interface in Thai Small Pig Farms Using a Questionnaire Survey. *Transbound Emerg Dis*. 2016;63(1):e135–9.
 69. Secretaría de gobernación. ACUERDO MEDIANTE EL CUAL SE DAN A CONOCER EN LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS LAS ENFERMEDADES Y PLAGAS EXOTICAS Y ENDEMICAS DE

- NOTIFICACION OBLIGATORIA DE LOS ANIMALES TERRESTRES Y ACUATICOS. [Internet]. [cited 2019 Jan 20]. Available from: http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5545304&fecha=29/11/2018
70. Tufiño C. Caracterización molecular de los virus de influenza A, que circulan en cerdos en la región del bajo mexicano. Universidad Nacional Autónoma de México; 2013.
 71. Cuevas E, Gonzalez C. Detección de orthomyxovirus H7N3 en anátidos del Estado de México. Redvet [Internet]. 2009;10(4). Available from: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040409/040909.pdf>
 72. Montalvo-Corral M, Hernández J. Genetic analysis of avian influenza virus from migratory waterfowl in Mexico. Arch Virol. 2010;155(1):97–101.
 73. Montalvo-Corral M, López-Robles G, Hernández J. Avian influenza survey in migrating waterfowl in Sonora, Mexico. Transbound Emerg Dis. 2011;58(1):63–8.
 74. Barrón-rodríguez RJ. Isolation and characterization from a temporary artificial pond in Mexico. Vet México OA. 2018;5(2):1–16.
 75. ORNELAS-EUSEBIO E, OBREGÓN-ASCENCIO A, CHÁVEZ-MAYA F, GARCÍA-ESPINOSA G. Molecular characterization of an influenza A virus (H4N2) isolated from waterfowl habitats in the State of Mexico. J Vet Med Sci [Internet]. 2015;77(3):365–9. Available from: https://www.jstage.jst.go.jp/article/jvms/77/3/77_14-0267/_article
 76. Wainwright S, Trevenec C, Claes F, Vargas M, Martin V, Lubroth L. Highly Pathogenic Avian Influenza in Mexico (H7N3) A significant threat to poultry production not to be underestimated. Empres Watch. 2012;26:1–9.
 77. Steffani Hernández G, Chávez Maya F, Rojas Anaya E, Loza Rubio E, García Espinosa G. Genomic analysis of an atypical mexican low-pathogenic H5N2 avian influenza virus. Vet Mex. 2016;3(2).
 78. Organización Mundial de Sanidad Animal. Base de datos del Sistema mundial de información zoonositaria (WAHIS Interface) [Internet]. 2012 [cited 2019 Jan 29]. Available from: https://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Countryinformation/Countryrep

orts

79. Gaytán L. Diversidad filogenética de virus de influenza en aves silvestres y su participación potencial en la transmisión interespecie en el Estado de México. Universidad Autónoma de México; 2019.
80. Fuente D, Boadella M, Drosten C, Ruiz-fons F, Estrada-pen A, Medley G, et al. Crossing the Interspecies Barrier: Opening the Door to Zoonotic Pathogens. 2014;10(6).
81. Karesh WB, Dobson A, Lloyd-Smith JO, Lubroth J, Dixon MA, Bennett M, et al. Ecology of zoonoses: Natural and unnatural histories. *Lancet* [Internet]. 2012;380(9857):1936–45. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61678-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61678-X)
82. Vavrek M. fossil: Palaeoecological and Palaeogeographical Analysis Tools [Internet]. 2012. Available from: <http://matthewvavrek.com/programs-and-code/fossil/>
83. Team R. R: A language and environment for computing. 2017.
84. (OIE) World Organization for Animal Health. Avian Influenza (Infection with Avian Influenza Viruses). *Man Diagnostic Tests Vaccines Terr Anim*. 2016;1–23.
85. World Organization for Animal Health. 2.8.7. Influenza A virus of swine. *Man Diagnostic Tests Vaccines Terr Anim* 2016 [Internet]. 2016; Available from: <http://www.oie.int/en/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>
86. Saavedra-Montañez M, Carrera-Aguirre V, Castillo-Juárez H, Rivera-Benitez F, Rosas-Estrada K, Pulido-Camarillo E, et al. Retrospective serological survey of influenza viruses in backyard pigs from Mexico City. *Influenza Other Respi Viruses*. 2013;7(5):827–32.
87. Stevenson M. epiR: Tools for the Analysis of Epidemiological Data [Internet]. 2018. Available from: <http://fvas.unimelb.edu.au/veam>
88. Ramakrishnan MA, Tu ZJ, Singh S, Chockalingam AK, Gramer MR, Wang P, et al. The feasibility of using high resolution genome sequencing of influenza A viruses to detect mixed infections and quasispecies. *PLoS One*. 2009;4(9).

89. Grech-Angelini S, Hervé S, Rose N, Barbier N, Casabianca F, Maestrini O, et al. Serological survey of influenza A viruses in domestic and wild Suidae in Corsica (France), a Mediterranean island environment. *Prev Vet Med* [Internet]. 2018;157(January):94–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.06.004>
90. Spackman E. *Animal Influenza Virus* [Internet]. Spackman E, editor. New York, NY: Springer New York; 2014. (Methods in Molecular Biology; vol. 1161). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-0758-8>
91. Szeleczyk Z, Tekes L, Ivanics É, Pálmai N, Szeredi L, Ursu K, et al. Tissue tropism of highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N1 in naturally infected mute swans (*Cygnus Olor*), domestic geese (*Anser Anser* var. *domestica*), pekin ducks (*Anas platyrhynchos*) and mulard ducks (*Cairina moschata* × *anas platyrhy*). *Acta Vet Hung*. 2010;58(1):133–45.
92. Capua I, Mutinelli F. Mortality in Muscovy ducks (*Cairina moschata*) and domestic geese (*Anser anser* var. *domestica*) associated with natural infection with a highly pathogenic avian influenza virus of H7N1 subtype. *Avian Pathol*. 2001;30(2):179–83.
93. Montalvo-corrall M, Burgara-estrella A. Serological and molecular prevalence of swine influenza virus on farms in northwestern Mexico. 2014;172:323–8.
94. Maya BA. Dinámica de infección y descripción del cuadro clínico del subtipo de Influenza H5N2 aviar, aislado en cerdo. Universidad Nacional Autónoma de México; 2017.
95. Vleeschauwer A De, Reeth K Van. Prior infection of pigs with swine influenza viruses is a barrier to infection with avian influenza viruses. *Vet Microbiol* [Internet]. 2010;146(3–4):340–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.05.013>
96. Suarez DL, Tang Y, Dearth R, Senne DA, Lee CW, Zhang Y, et al. Isolation and Characterization of H3N2 Influenza A Virus from Turkeys. *Avian Dis*. 2006;49(2):207–13.
97. Suarez DL, Woolcock PR, Bermudez AJ, Senne DA. Isolation from Turkey Breeder Hens of a Reassortant H1N2 Influenza Virus with Swine, Human,

- and Avian Lineage Genes. *Avian Dis.* 2006;46(1):111–21.
98. Easterday BC, Gustafson GA, Mohan R, Erickson GA, Saif YM. Serologic and Epidemiologic Evidence of Infection in Turkeys with an Agent Related to the Swine Influenza Virus. *Avian Dis.* 2006;25(1):11.
 99. Swayne DE, Suarez DL, Sims LD. *Influenza.* 2003;181–218.
 100. Olsen CW, Karasin A, Erickson G. Characterization of a swine-like reassortant H1N2 influenza virus isolated from a wild duck in the United States. *Virus Res.* 2003;93(1):115–21.
 101. Zhou H, Zhang A, Chen H, Jin M. Emergence of novel reassortant H3N2 influenza viruses among ducks in China. *Arch Virol.* 2011;156(6):1045–8.
 102. Slingenbergh J, Conraths FJ, Füßel A-E, Mettenleiter TC, Schwabenbauer K, Vallat B, et al. Animal health in the 21st century—A global challenge. *Prev Vet Med.* 2011;102(2):93–7.
 103. Cappelle J, Gaidet N, Iverson SA, Takekawa JY, Newman SH, Fofana B, et al. Characterizing the interface between wild ducks and poultry to evaluate the potential of transmission of avian pathogens. *Int J Health Geogr* [Internet]. 2011;10(1):60. Available from: <http://www.ij-healthgeographics.com/content/10/1/60>
 104. Su S, Bi Y, Wong G, Gray GC, Gao GF. Epidemiology , Evolution , and Recent Outbreaks of Avian Influenza Virus in China. 2015;89(17):8671–6.