



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**Diversidad filogenética de virus de influenza en aves silvestres y su
participación potencial en la transmisión interespecie en el Estado de México**

TESIS

que para optar por el grado de

Maestra en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

Presenta:

LILIANA GAYTÁN CRUZ

Tutor principal

RAFAEL OJEDA FLORES

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Comité tutor

GARY GARCÍA ESPINOSA

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

HELIOT ZARZA VILLANUEVA

Universidad Autónoma Metropolitana



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

DEDICATORIAS

A mis padres que amo profundamente. A mis hermanas Mali y Pili que adoro.

A mi amor, Julio a quien amo y me ama.

A mis tías Jose y Lola que siempre están conmigo.

Gracias infinitas a todos por quererme y amarme tanto y por apoyarme en todo momento, por impulsarme en la vida y compartir felicidad inmensa, hacerme reír y darme sus sabios consejos. Las palabras se quedan cortas. Sin ustedes no hubiera podido desarrollar y concluir esta etapa profesional.

A las aves por existir, embellecer la vida.

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores, los doctores Heliot Zarza Villanueva, Gary García Espinosa por su tiempo, disposición, asesoría y por compartir sus conocimientos y experiencias en todo momento, en especial mi tutor principal, Rafael Ojeda Flores, gracias totales.

A los miembros del jurado, los doctores Raúl José Bobes Ruíz, Oscar Rico Chávez, José Iván Sánchez Betancourt, y Heliot Zarza por sus recomendaciones, aportaciones y valiosa asesoría para la escritura y conclusión de este trabajo.

A mis compañeros y amigos “influenzólogos” Cecilia Montoya, Manuel Moguel, especialmente a Jéssica Mateus por el excelente trabajo en equipo.

Al CONACyT y al proyecto PAPIIT IA205916 por los recursos económicos brindados para la realización de esta investigación.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por darme la oportunidad de llevar a cabo este proyecto. Agradezco al programa de Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, en especial a la doctora Clara Aguillón por toda la atención brindada, así como a los profesores de las asignaturas por sus enseñanzas.

A los productores del Municipio de Lerma que autorizaron trabajar con sus aves domésticas, al sr. Emilio Barranco y participantes en la UMA “Ejido San Antonio de Los Llanitos” por permitir la colecta de muestras a partir de patos silvestres.

A todo el equipo del Laboratorio de Ecología de Enfermedades y una Salud por compartir sus amplios conocimientos y contagiarme día a día el entusiasmo y amor a la investigación.

A la Unidad de investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia – UNAM. A los doctores Iván Sánchez, René Segura, Rebeca Martínez Bautista, por valiosa asesoría, por la detección molecular y por la realización de la secuenciación de ácidos nucleicos.

A todo el Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos de la FMVZ. Al doctor Gerardo Ramírez. Especialmente a la doctora Rebeca Martínez, gracias por la capacitación brindada en el laboratorio. A Brenda Maya, Carmen Gaitán por su enorme apoyo en la realización del trabajo de laboratorio. Al laboratorista Inocente Lara por su disposición y ayuda.

A Manuel Saavedra, Rodrigo Barrón, Laura Rojas, Citlali López, Víctor Rodríguez, Memo Orta, Karla Solórzano, Luis Ramírez, Helga Ochoterena, Alejandro Torres, Maricarmen Villalobos, Paola Martínez, Julio Ortega, gracias por su apoyo en la resolución de dudas, en el trabajo en campo, en laboratorio o en los diseños de figuras.

Al Programa de Academic Writing UNAM y al Departamento de inglés de la FMVZ por compartir su amplia experiencia y conocimientos en el idioma inglés para la mejora académica.

Contenido

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
LISTA DE CUADROS.....	3
LISTA DE FIGURAS	3
INTRODUCCIÓN.....	4
Importancia de la Influenza A	4
Características de los virus de influenza A y persistencia en el ambiente	5
Patrones evolutivos de los Virus de Influenza A	6
Hospederos de los Virus de Influenza A.....	7
Transmisión interespecie	11
Filogeografía de los Virus de Influenza A	12
Investigación en México.....	13
Justificación	16
Objetivo.....	16
Objetivos específicos:	16
Hipótesis	17
MATERIALES Y MÉTODOS	18
Área de estudio.....	18
Caracterización de las granjas de traspatio.....	19
Colecta de muestras	20
Diagnóstico molecular	22
Elaboración de agregados	22
Extracción de ácidos nucleicos	22
RT-PCR en Tiempo Real	22
Aislamiento viral.....	23
Replicación viral de muestras positivas a VIA identificados en patos silvestres.....	23
Secuenciación de ácidos nucleicos	25
Análisis filogenéticos	25
RESULTADOS	27
Caracterización de las granjas.....	27
Factores antropogénicos.....	27

Características de las granjas	27
Muestras colectadas	31
Aves silvestres	31
Aves domésticas	33
Diagnóstico molecular	34
Patos silvestres	34
Aves domésticas	36
Aislamiento viral y secuencias	36
Secuenciación y análisis filogenéticos.....	36
Secuencias relacionadas con subtipos silvestres	36
Secuencias obtenidas a partir de patos migratorios relacionadas con subtipos detectados en animales domésticos	47
DISCUSIÓN	50
CONCLUSIONES.....	56
ABREVIATURAS.....	57
ANEXOS	58
Anexo 1. Secuencias de ácidos nucleicos del VIA H5N2 aislado a partir de <i>Anas platyrhynchos diazi</i>	58
Gen PB2.....	58
Gen PB1.....	59
Gen PA.....	60
Gen HA	61
Gen NP	62
Gen NA	63
Gen M	63
Gen NS	64
Anexo 2. Árboles filogenéticos de los VIA aislados en ocho muestras de patos migratorios	65
Figura 6. Árboles filogenéticos de los VIA H5N2 relacionados con subtipos porcinos y aviares.....	65
Figura 7. Árboles filogenéticos de los VIA H3N2 relacionados con subtipos porcinos.	73
Figura 8. Árboles filogenéticos del VIA H1N1 relacionado con subtipos porcinos.....	81
Anexo 3. Eventos microestructurales en las secuencias obtenidas en patos migratorios	89

BIBLIOGRAFÍA91

RESUMEN

La influenza A es una enfermedad zoonótica emergente que suele tener alto impacto en la salud humana y en la salud y la producción animal, generando pérdidas económicas importantes. Debido a su alta variabilidad genética, los virus de influenza A pueden adaptarse a múltiples hospederos, incluyendo aves silvestres, domésticas y mamíferos. Diversos factores ambientales y antropogénicos pueden facilitar su transmisión de un hospedero a otro, además de las características propias de los virus y de los propios hospederos. Las áreas de interfaz que se caracterizan por la convergencia de granjas bajo sistemas de traspato en cercanía a humedales donde habitan aves silvestres favorecen el contacto entre diferentes especies, y, por ende, la transmisión interespecie de los virus de influenza. Debido a ello, el objetivo de este estudio fue determinar y analizar la diversidad filogenética de los virus de influenza A que circulan en patos silvestres y en aves domésticas en un área de interfaz que se asocia con el área natural protegida, las Ciénegas de Lerma, Estado de México. Se colectaron muestras con hisopo de la cloaca de patos silvestres y de aves domésticas, además de muestras orofaríngeas en este último grupo de aves procedentes de granjas de traspato circundantes a las Ciénegas de Lerma. Se realizó RT-PCR en tiempo real, aislamiento viral, secuenciación de ácidos nucleicos a partir de los virus aislados de las muestras positivas, análisis filogenéticos, y se caracterizó la zona de muestreo. Se obtuvieron 597 muestras de 10 especies de anátidos silvestres, 22 de ellas positivas mediante RT-PCR, así como 9 virus aislados provenientes de muestras de 4 especies diferentes. Las 206 muestras de aves domésticas resultaron negativas mediante la técnica de RT-PCR, por lo que no se detectó transmisión interespecie entre aves silvestres y domésticas. Se identificaron tres subtipos, H5N2, H3N2 y H1N1. Cuatro virus fueron H5N2, cuatro H3N2 y uno H1N1. Uno de los virus H5N2 aislados a partir de *Anas platyrhynchos diazi* está conformado por genes de diferentes subtipos. Los ocho virus restantes se relacionaron filogenéticamente con subtipos de origen porcino y aviar aislados en años anteriores en la región de estudio. Es necesario demostrar en futuros estudios cómo se infectaron los patos silvestres migratorios con subtipos de virus de influenza de porcinos. Este tipo de estudios ayudarán a entender la ecología del virus de influenza A en el medio silvestre en una interfaz con animales domésticos y sus potenciales repercusiones a la economía regional y a la salud pública, tomando en consideración factores virales, de los hospederos, los ambientales y los antropogénicos.

Palabras clave: Ciénegas de Lerma, interfaz, patos migratorios, *Anas platyrhynchos diazi* pollos, aves y cerdos domésticos de traspato.

ABSTRACT

Avian influenza is an emerging zoonotic disease that usually has a high impact on public health and animal production, which causes important economic losses. Due to its high genetic variability, the influenza A virus can adapt to multiple hosts, including wild and domestic birds, and mammals. Several environmental and human factors can facilitate virus transmission between different hosts, in addition to viral and hosts features. Interface areas characterized by the concurrence of backyard farm systems close to wetlands with wild bird populations facilitate contact among different species, and, hence, the influenza virus interspecies transmission. Because of that, the aim of this study was to determine and to analyse the influenza A virus phylogenetic diversity circulating in wild ducks and domestic birds in an interface associated to a natural protected area, The Lerma's Swamp, State of Mexico. Cloacal swabs were collected from wild ducks and domestic birds, as well as oropharyngeal samples from backyard farms poultry surrounding Lerma's Swamp. RT-PCR and virus isolation, nucleic acid sequencing and phylogenetic analyses from the isolated virus were performed. Sampling area was characterized. 22 of 597 samples from 10 wild anatid species were positive to influenza virus by RT-PCR. From those, 9 viruses were isolated corresponding to four different wild bird species. All 206 domestic backyard bird samples were negative by RT-PCR, consequently, the interspecies transmission was not detected among wild and domestic birds. H5N2, H3N2, and H1N1 subtypes were identified. Four viruses were identified as H5N2, four as H3N2 and one as H1N1 subtypes. One H5N2 virus isolated from *Anas platyrhynchos diazi* contained genes from different subtypes. Eight remain viruses were phylogenetically related with swine and avian subtypes isolated previously in the study area. It is necessary to demonstrate in future studies how wild migratory ducks were infected with swine subtypes. This investigation could help to understand influenza A virus ecology in the wild-domestic animals interface and its potential implications to regional economy and public health, by incorporating viral, hosts, environmental and human factors.

Key words: Lerma's Swamp, interface, migratory waterfowl, *Anas platyrhynchos diazi* chicken, domestic backyard birds and swine.

LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1. Características de las granjas de aves domésticas de traspatio
- Cuadro 2. Número de muestras obtenidas de 10 especies de patos silvestres
- Cuadro 3. Muestras colectadas de aves de traspatio por granja
- Cuadro 4. Anátidos positivos a virus de influenza A mediante qRT-PCR
- Cuadro 5. Homología, identidad de nucleótidos y distancia genética por segmento del genoma de VIA aislado a partir del pato mexicano
- Cuadro 6. Identidad de cada segmento de los ocho VIA porcinos y aviares aislados en patos migratorios

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Las cuatro rutas migratorias en Norteamérica.
- Figura 2. Sitios de colecta de muestras de aves domésticas de traspatio.
- Figura 3. Línea de tiempo de muestreos de aves silvestres y domésticas.
- Figura 4. Gráfica de qRT-PCR de las 22 muestras positivas a VIA
- Figura 5. Árbol filogenético construido con el algoritmo Máxima verosimilitud del VIA aislado a partir de *Anas platyrhynchos diazi*
- Figura 6. Árboles filogenéticos de los VIA H5N2 relacionados con subtipos porcinos y aviares.
- Figura 7. Árboles filogenéticos de los VIA H3N2 relacionados con subtipos porcinos.
- Figura 8. Árboles filogenéticos del VIA H1N1 relacionado con subtipos porcinos.
- Figura 9. Presencia de un gap en el gen M del virus H5N2 aislado en patos migratorios con respecto a (Gto.)
- Figura 10. Mutaciones en el gen HA de los virus H3N2 aislados en patos migratorios con respecto de (Mex51)

INTRODUCCIÓN

Importancia de la Influenza A

Los virus de influenza A se asocian con un amplio número de hospederos y tienen potencial emergente y zoonótico debido a su gran variabilidad genética y adaptabilidad a aves y mamíferos, incluidos los humanos. La influenza A es una enfermedad que ha tenido grandes impactos en la producción y salud animal, en la salud humana y, por ende, ha provocado y sigue provocando importantes pérdidas económicas en todo el mundo (Timofeeva *et al.*, 2017). La transmisión de estos virus entre sus hospederos está ligada a interacciones epidemiológicas o ecológicas que involucran diferentes factores de riesgo relacionados con acciones humanas, así como factores ambientales que permiten o no la persistencia de los virus, y por lo tanto así su transmisión (Caron *et al.*, 2010; Simms y Jeggo, 2014a). Algunos de ellos incluyen el comercio formal e informal de aves, producciones de traspatio carentes de medidas de bioseguridad, actividad cinegética, urbanización, entre otros factores que en conjunto pueden facilitar el contacto de reservorios silvestres del virus con animales domésticos y con el ser humano. Esta complejidad resalta la importancia de estudiar estos patógenos de forma integral, tomando en consideración los factores ambientales involucrados en la transmisión.

Los virus de influenza A (VIA) han causado importantes pandemias en diversas épocas, como la llamada Gripe Española en 1918, provocada por el virus H1N1, que provocó la muerte a más de 50 millones de personas en todo el mundo (Suzuki, 2006); la Gripe Asiática en 1957, provocada por el subtipo H2N2, donde perecieron casi 4 millones de personas; la Gripe de Hong Kong, enfermedad causada por el subtipo H3N2 en 1968, donde sucumbieron 2 millones de personas. La pandemia más reciente en México y en Estados Unidos, en 2009, fue causada por un subtipo H1N1 por la recombinación de VIA de origen aviar, porcino y humano, causando entre 151,700 a 575,400 muertes humanas en 30 países (Smith *et al.*, 2009a; CDC, 2012). Esta capacidad de recombinación permite a los virus de influenza adaptarse a nuevos hospederos, lo cual se ve favorecido con la congregación de diferentes especies, tanto de aves silvestres, como de animales domésticos, tal y como ocurre en producciones familiares de traspatio en cercanía con zonas de descanso y alimentación de aves acuáticas migratorias.

Características de los virus de influenza A y persistencia en el ambiente

Los VIA son miembros de la familia Orthomyxoviridae, género *Influenzavirus A*, especie Virus de Influenza A (Influenza A Virus). Su genoma está formado por una cadena de ARN de sentido negativo que consta de 8 segmentos que codifican de 12 a 14 proteínas. El tamaño de sus segmentos oscila entre 890 y 2341 nanómetros. El virión mide de 80 a 120 nt y es envuelto. El tamaño de su genoma es de 13.5 Kilobases. Los segmentos del primero al tercero codifican las proteínas de la polimerasa: polimerasa básica 2 (PB2), polimerasa básica 1 (PB1), y polimerasa ácida (PA). Los segmentos del 4 y 6 codifican las glicoproteínas virales de la superficie, la hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). El segmento 5 llamado nucleoproteína (NP) codifica la proteína estructural que forma la cápside del RNA viral y junto con las proteínas de la polimerasa forma el complejo de las ribonucleoproteínas (RNPs). El segmento 7 codifica la proteína de matriz estructural (M1) que es la más abundante en los viriones, se une a la membrana y une RNA viral, y la proteína del canal iónico (M2) que se incorpora en la membrana viral y se regula por el pH. El segmento 8 codifica la proteína no estructural (NS1) y la proteína de exporte nuclear (NEP); la proteína NS1 es antagonista de la respuesta sistema inmune mediante su actividad anti interferón interfiriendo con la expresión de los genes del hospedero, mientras que la NEP interviene en el exporte nuclear de las RNPs al citoplasma previo al ensamble del virión (Salazar *et al.*, 2009).

Los VIA se clasifican en subtipos con base en las glicoproteínas que estos virus presentan en su superficie, la HA y la NA. La HA se une al ácido siálico que se encuentra en las células de los hospederos, lo cual permite la fusión de la membrana viral con la membrana celular y la liberación de las RNPs virales al citoplasma. La NA es una sialidasa que principalmente facilita la salida de las partículas virales de la célula infectada debido al corte del ácido siálico de la superficie celular (Bodewes y Kuiken, 2018).

La persistencia de los VIA en el ambiente después de su excreción depende de varios factores. Los VIA pueden persistir en el agua, la cual podría tener una participación importante en la diseminación del virus, pero su viabilidad en este elemento depende de distintos factores, principalmente de la temperatura, pH y salinidad (Stallknecht *et al.*, 1990). En primera instancia, la persistencia de los VIA en ambientes acuáticos es fuertemente

influenciada por la temperatura, puede persistir en agua dulce hasta por 100 días con una temperatura de 17°C, donde la transmisión por vía fecal-oral es más común (Stallknecht *et al.*, 1990; Beldomenico y Uhart, 2008). Bajas temperaturas, principalmente de 4°C, favorecen la viabilidad de los VIA más que temperaturas medias y altas, 20°C y 37°C respectivamente (Davidson *et al.*, 2010). El pH del agua también tiene una gran influencia, un pH neutral-básico de 7 a 8.5 favorece la persistencia de los VIA junto con concentraciones bajas de amonio, a diferencia de un pH ácido de 5, que ya es detrimental para los VIA, comparado con un pH de 7 a la misma temperatura (Keeler *et al.*, 2014). Otros estudios bajo condiciones controladas indican que una combinación de temperaturas menores a 17°C, pH de 7.4 a 8.2, y bajas concentraciones de salinidad (de 0–200,000 ppm) es muy favorable para la persistencia viral (Brown *et al.*, 2009). Por otra parte, existe mayor persistencia en agua dulce que en agua salada (Stallknecht *et al.*, 1990; Stallknecht *et al.*, 1990). Con relación a estos factores abióticos, estudios experimentales sugieren que los VIA altamente patógenos podrían estar menos adaptados que los VIA de baja patogenicidad (BP) para diseminarse por la ruta fecal – oral en el agua (Lebarbenchon *et al.*, 2010). Sin embargo, estos parámetros *in situ* varían en el tiempo, incluso la variación también puede estar influenciada por las características del humedal del que se trate, lo que podría ser adverso para la persistencia de los virus de influenza (Obregón-Ascencio, 2011).

Patrones evolutivos de los Virus de Influenza A

Los VIA tienen un alto potencial de diversificación genética, porque pueden evolucionar a través de diversos mecanismos (Munoz *et al.*, 2016). La falta de mecanismos de reparación durante la replicación de su ARN (reparación por escisión de bases, reparación por escisión de nucleótidos, reparación por apareamiento erróneo, reparación inducida, reparación de quiebres en doble cadena o reparación directa por reversión de la lesión) y el genoma segmentado dan las bases para la naturaleza adaptativa de estos virus (Taufert y Marin, 2014). La continua evolución se da principalmente en las glicoproteínas de superficie, pero también en cada uno de sus ocho segmentos. La ARN polimerasa propensa al error permite una alta frecuencia de mutaciones durante la replicación, en donde puede cambiar un nucleótido, lo que puede dar pie a sustituciones de aminoácidos, resultando en la formación

de *cuasiespecies* dentro de un hospedero o una población de hospederos. Este proceso llamado *deriva génica* o *antigenic drift*, confiere a los VIA la habilidad de generar rápidamente variantes antigénicas que pueden escapar del sistema inmune del hospedero, y también genotipos que proveen resistencia a agentes antivirales (Boni *et al.*, 2008; Pompei, Loreto y Tria, 2012; Freidl *et al.*, 2014; Munoz *et al.*, 2016). Cuando dos virus diferentes coinfectan a una misma célula, los diferentes segmentos pueden intercambiarse o reorganizarse y dar lugar a viriones con nueva combinación de segmentos en su progenie que pueden producir nuevas cepas. Algunas de éstas podrían aumentar su virulencia, proceso llamado *reordenamiento o arreglo genético, antigenic o genetic shift* (Fuller *et al.*, 2013). Estos arreglos pueden tener una participación muy importante en la generación de brotes epidemiológicos en animales domésticos e incluso pandemias en los humanos.

Hospederos de los Virus de Influenza A

Los hospederos de los VIA principalmente son las aves acuáticas y mamíferos, entre ellos los animales domésticos, como los cerdos, los caballos, los perros, y los seres humanos (Hulo *et al.*, 2011). También se han reportado diversos hospederos accidentales como ballenas, felinos, focas, entre otros (Hulo *et al.*, 2011; Munoz *et al.*, 2016). Se tienen reconocidos 18 subtipos de HA (H1-H18), y 11 subtipos de NA (N1-N11). Los subtipos H1 a H16 y N1 a N9 han sido identificados en aves acuáticas de los órdenes Anseriformes (patos, gansos y cisnes) y Charadriiformes (gaviotas, aves limícolas, charranes). Estas aves son consideradas los reservorios naturales de los VIA, especialmente los patos de los géneros *Anas*, *Spatula* y *Mareca* (Webster *et al.*, 1992; Olsen *et al.*, 2006a; Munster *et al.*, 2007). Los subtipos H17, H18, N10 y N11 han sido identificados únicamente en murciélagos (Tong *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2014). Cada virus tiene alguna combinación de HA y NA, y al menos 103 de las 144 posibles combinaciones de influenza A se han encontrado en aves silvestres (Dugan *et al.*, 2008). Existen estudios que indican la afinidad de estos virus por ciertos hospederos, y, por ende, ciertos subtipos son más comunes en ciertas especies, por ejemplo, H13 y H16 se han identificado casi exclusivamente en Charadriiformes, específicamente en especies de la Familia Laridae, como gaviotas y charranes (Olsen *et al.*, 2006a; Munster y Fouchier, 2009). En el caso de los mamíferos domésticos como en el cerdo, se han identificado los subtipos H1 y H3; El subtipo H3 en caballos y perros, y en humano combinaciones de H1, H2 y H3 con N1 y N2 (Freidl *et al.*, 2014).

Los VIA generalmente no provocan enfermedad letal en sus hospederos naturales, lo que indica que estos virus han logrado adaptación en éstos (Horimoto y Kawaoka, 2001). Estos virus también se clasifican con base en la afectación que provocan en aves domésticas: VIA de baja patogenicidad (VIABP) y de alta patogenicidad (VIAAP). Los VIABP en aves domésticas pueden provocar una enfermedad subclínica o una infección leve con signos clínicos moderados con mortalidades bajas. Sin embargo, pueden ser los precursores de los VIAAP, en donde generalmente producen signos clínicos severos y mortalidades altas. Algunos subtipos H5 y H7 pueden evolucionar a VIAAP para las gallináceas (e.g. gallinas, guajolotes y codornices), provocando una infección sistémica, debido a la introducción de aminoácidos básicos en el sitio de corte de la HA, pero no todos los H5 y H7 son virulentos. En caso contrario, los VIABP se caracterizan por la ausencia de múltiples aminoácidos básicos en el sitio de corte de la HA, y la infección se limita a los tractos respiratorios o entéricos (Lebarbenchon *et al.*, 2010; Spackman, 2014). Las aves acuáticas usualmente permanecen asintomáticas, aun cuando son infectadas por VIAAP (Senne *et al.*, 1996; Verhagen, Fouchier y Kuiken, 2016; Bodewes y Kuiken, 2018).

Se ha identificado que ciertos factores antropogénicos, tales como la cercanía de viviendas rurales a los humedales con sistemas productivos de traspatio aumentan la probabilidad de contacto directo o indirecto entre aves silvestres y domésticas. Esta interacción favorece el contacto y la evolución de los agentes virales y su adaptación hacia nuevos hospederos y sistemas biológicos (Murray y Daszak, 2013), que puede derivar en el surgimiento de nuevas variantes antigénicas (Cappelle *et al.*, 2011; Simms y Jeggo, 2014b).

Los sistemas productivos de traspatio o producción familiar propician la interacción entre especies silvestres y animales domésticos, e incluso humanos. Estos sistemas son de gran importancia a nivel local, ya que proveen de fuentes de proteína y económica a los pequeños productores. Además, es la forma de producción más predominante en las zonas rurales de México (hasta el 75%) y del mundo. Una de sus características es que carecen de condiciones adecuadas de bioseguridad, lo que permite un gran contacto con diferentes especies animales, lo que facilita la transmisión interespecie (FAO, 2010; Gutiérrez-Ruiz, *et al.*, 2012).

Se ha reconocido que los patos domésticos pueden ser un factor clave para la emergencia y diseminación de VIA con potencial zoonótico, ya que estos animales podrían fungir como hospederos amplificadores, sirviendo como “mezcladores de virus” y podrían transmitir diferentes combinaciones de VIA a aves domésticas de los géneros *Gallus* al entrar en contacto con éstas, con el potencial de transmitirse a otros animales domésticos y a humanos (Daszak, Cunningham e Hyatt, 2001; Lam *et al.*, 2013). Ejemplo de lo anterior es el pato doméstico Pekín, que de acuerdo a un estudio experimental, se considera como un potencial reservorio para el subtipo H5N2 aviar de BP que circula en los sistemas de producción en México (Godínez García, 2011). Los cerdos también se han considerado como mezcladores de virus de influenza de diferentes orígenes. En la actualidad, en estos hospederos se distribuyen principalmente los virus H1N1, H3N2 y H1N2 a nivel mundial, pero también se han aislado subtipos como H3N3, H4N6, H5N2 y H9N2 (Lipatov *et al.*, 2008; Yassine, Lee y Saif, 2011; Sánchez-Betancourt *et al.*, 2017).

En México se ha identificado la circulación continua de VIA en cerdos de traspatio. Un estudio en Veracruz identificó VIA ampliamente distribuidos (alrededor de un 90%) en sistemas de producción de traspatio, particularmente los subtipos H1N1 y H3N2, destacando la importancia epidemiológica de la circulación de los VIA en éstas y en otras especies, y en estos sistemas de producción (Pérez Rivera, 2010). En otro estudio realizado en granjas de traspatio de la Ciudad de México, se encontraron seroprevalencias de influenza clásica porcina H1N1, influenza triple recombinante H3N2, influenza pandémica H1N1 e influenza estacional humana H1N1 con el 74%, 24%, 17% y 1.3%, respectivamente en un periodo de 10 años (2000-2009) (Saavedra-Montañez *et al.*, 2013).

Las aves durante el periodo de migración se desplazan a grandes distancias, siendo este un factor importante en la diseminación de los virus entre regiones o incluso continentes y se ha documentado que pueden excretarlos sin presentar signos clínicos, incluso alrededor de un periodo de 5 días. Sobre todo, el pato de collar, *Anas platyrhynchos*, en el caso particular de VIAAP H5N1, se determinó una abundante excreción viral sin evidencia patológica de enfermedad debilitante (Olsen *et al.*, 2006b; Keawcharoen *et al.*, 2008; Verhagen, Herfst y Fouchier, 2015). Por ende, los cuerpos de agua que sirven de descanso, refugio y alimentación para patos durante la migración invernal y que mantienen la congregación de poblaciones de aves acuáticas, favorecen la transmisión de VIBP entre

las especies (Olsen *et al.*, 2006a). En México existen importantes humedales naturales y artificiales a lo largo de su territorio, muchos de ellos se ubican a lo largo de las rutas migratorias de aves silvestres que viajan desde Canadá y Estados Unidos hacia Centroamérica: la ruta del Pacífico, la ruta Central, la ruta del Mississippi y la ruta del Atlántico (Figura 1), en donde se han identificado VIA en diversas especies de anátidos tanto residentes como migratorios (Hernández-Colina, Yadeun y García-Espinosa, 2017).

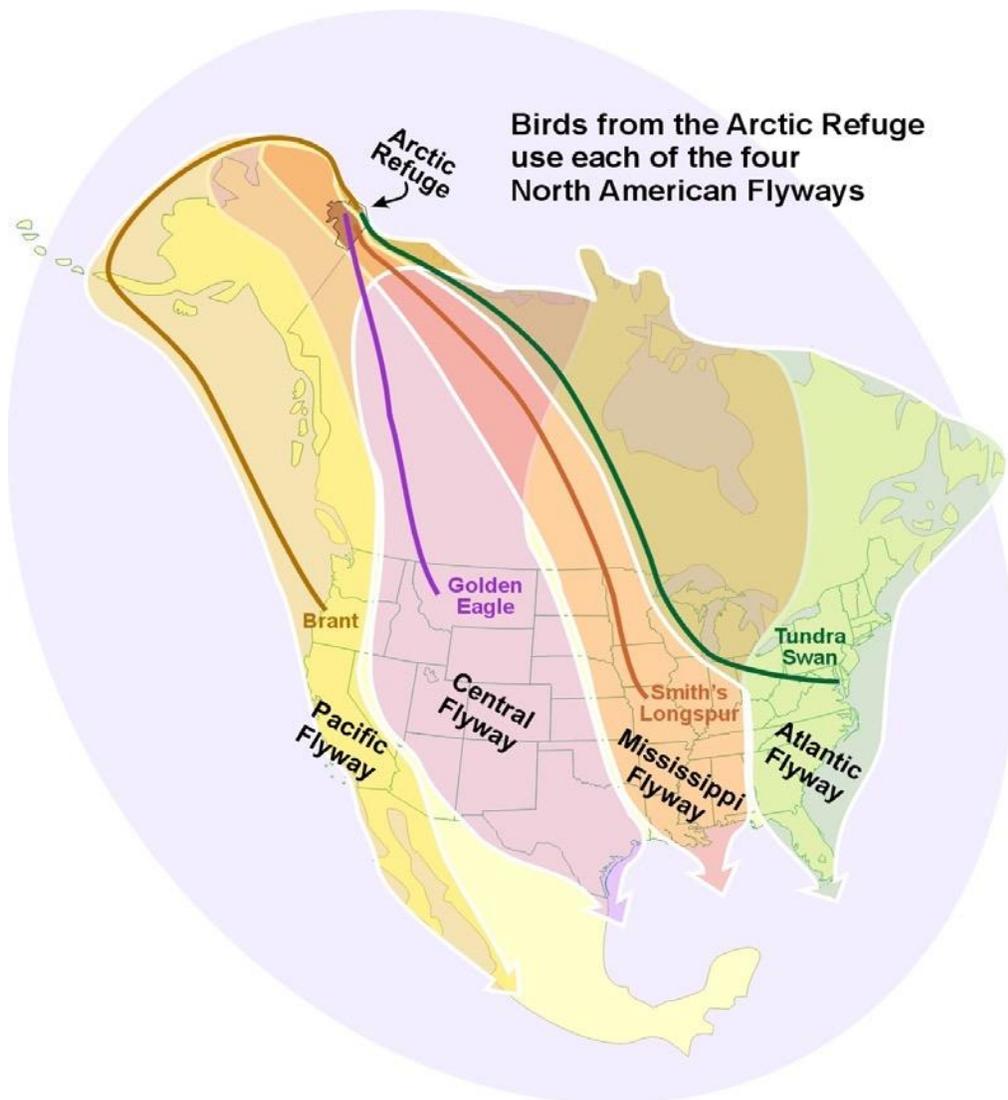


Figura 1. Las cuatro rutas migratorias en Norteamérica: Pacífico, Central, Mississippi y Atlántico, que ocupan las aves durante la temporada invernal.

Fuente: <https://www.fws.gov/refuge/arctic/birdmig.html>

Transmisión interespecie

Para que ocurra una transmisión entre especies diferentes, la interacción de los virus con los hospederos es un punto clave (Spackman, 2009). En general, se necesitan tres componentes principales para que un patógeno pueda cruzar la barrera interespecie: la circulación de éste en el hospedero reservorio, el contacto con una especie diferente, y la probabilidad de que el nuevo hospedador sea infectado (Lloyd-Smith *et al.*, 2009). Para que pueda ocurrir un *salto* o *transmisión interespecie*, es necesario el contacto directo o indirecto entre diferentes grupos taxonómicos, sus ambientes o sus productos, que coincidan en tiempo y espacio, lo que se define como *interfaz* (Lloyd-Smith *et al.*, 2009; Gortazar *et al.*, 2014). En éstas interfaces, cada uno de los componentes se ve afectado por procesos ecológicos, factores del hospedador, y características propias de los patógenos (Chan *et al.*, 2013; Gortazar *et al.*, 2014). En el caso particular del establecimiento de los VIA en nuevos hospederos no es directo, sino que tienen que adaptarse a él atravesando diversos obstáculos, deben primero adherirse a los receptores celulares adecuados en un sitio anatómico accesible, ingresar a la célula, replicarse dentro de ésta, contrarrestar el sistema inmune del hospedero, salir de la célula y finalmente tener la manera más eficiente de salir del hospedero para infectar otro hospedero distinto (Capua y Munoz, 2013). Se ha reconocido que cuando se congregan aves anseriformes silvestres en proximidad a aves domésticas, aunado a los factores mencionados, se facilita la transmisión interespecie y consecuentemente se puede favorecer la mezcla de diferentes cepas de VIA, que podrían formar nuevos subtipos (Chan *et al.*, 2013; Cappelle *et al.*, 2014). Un ejemplo claro es cuando se presentaron brotes en Asia del VIAAP H5N1 en aves domésticas, aunado al brote en humanos de VIA H1N1 de origen porcino, en donde los VIA se adaptaron a nuevas especies y nuevas condiciones ambientales (Garten *et al.*, 2009).

La transmisión de VIA entre diferentes especies de aves es muy compleja, ya que depende de factores inherentes a la cepa viral, a las especies involucradas en el proceso de transmisión, y a distintos factores ambientales y antropogénicos como cambio climático, cambio de uso de suelo, manejo de los animales en libertad y domésticos, así como comercio de animales y sus productos (Alexander, 2007; Vandegrift *et al.*, 2010; Murray y Daszak, 2013; Gortazar *et al.*, 2014).

De hecho, se ha documentado que en el proceso de adaptación donde un VIABP puede derivar en un VIAAP y se dé el salto interespecie, intervienen factores ecológicos como las estructuras o densidades poblacionales (por ejemplo, sistemas productivos de aves o la producción de patos domésticos en libre pastoreo, mercado de animales vivos), dispersión de los hospederos (migración de aves silvestres, comercio y transporte de ave domésticas y sus productos), diversidad de hospederos, entre otros (Lebarbenchon *et al.*, 2010). Se considera que la principal transmisión de VIABP entre aves acuáticas es la ruta fecal – oral, debido a que los VIA se replican mayormente en intestino y los viriones son excretados por la cloaca hacia el agua. En contraste, estudios indican que los VIAAP, como el H5N1 pueden replicarse más en vías respiratorias altas de las gallináceas (Horimoto y Kawaoka, 2001; Lebarbenchon *et al.*, 2010).

Existen diferentes datos en cuanto a la excreción viral en anátidos. Por ejemplo, se ha identificado que los patos silvestres pueden excretar los VIABP en promedio durante 10 días vía oral y 11.5 días vía cloacal, y los VIAAP durante 5 días por ambas rutas (Hénaux y Samuel, 2011). Otro estudio documentó que en los patos domésticos estos virus pueden excretarse hasta por 17 días dependiendo de la cepa de AP, lo que contrastó con los patos silvestres que pueden excretar los VIABP en un periodo más corto: de 3 a 8 días (Latorre-Margalef *et al.*, 2009). Con respecto a los cerdos, el periodo de excreción viral se da durante los primeros siete días postinfección; estas especies pueden ser infectadas por virus porcinos, aviáres y humanos, por lo que desempeñan un papel crucial en la evolución de estos virus. De hecho, los eventos de rearrreglos en cerdos pueden generar nuevos virus con potencial pandémico para humanos (Webster *et al.*, 1992; de Silva *et al.*, 2012).

Filogeografía de los Virus de Influenza A

Los análisis filogenéticos de los VIA, ya sea en aves silvestres como en domésticas, indican que distintos linajes divergen con base en factores geográficos, más que por factores asociados con la temporalidad o con los hospederos. Un ejemplo de ello son los virus del subtipo H7, que se dividen en linajes Euroasiáticos y Americanos (Alexander, 2007). El hecho de que los continentes estén separados geográficamente influye en la genética evolutiva de los VIA, los cuales pueden ser divididos en dos linajes filogenéticos principales, el Americano y el Euroasiático. Esta influencia se ve reflejada en una segregación

geográfica entre virus aislados de especies aviares que utilizan los corredores migratorios de América y Eurasia-África-Australia. Esta separación alopatrica ha derivado en una importante división filogenética entre los linajes genéticos de virus de influenza A Americanos y Euroasiáticos (Verhagen, Fouchier y Kuiken, 2016). A pesar de esto, la separación de esas poblaciones virales no es absoluta, la avifauna de Norteamérica y Eurasia no están completamente separadas. Algunos anátidos como el pato golondrino, *Anas acuta*, y algunas aves playeras, cruzan el Estrecho de Bering durante la migración, o bien, tienen rangos reproductivos que incluyen el noroeste de América y el Oriente ruso. De hecho, se han aislado virus de influenza con mezclas de genes de los linajes Americano y Euroasiático, indicando que la especiación alopatrica es parcial y que ocurren intercambios de segmentos genéticos entre las dos poblaciones virales (Van Borm *et al.*, 2012). Un ejemplo claro es el VIA H1N2 que provocó la pandemia de influenza en 2009, al tratarse de un virus triple rearrreglado entre virus porcinos de Norteamérica y linajes aviares Euroasiáticos (Smith *et al.*, 2009b).

Investigación en México

Recientemente en México se han realizado estudios que han evidenciado la circulación de VIA en hospederos silvestres y domésticos, así como en ambientes acuáticos. En aves silvestres migratorias la investigación ha sido escasa. En el estado de Sonora, se identificaron los subtipos H5, H6, H7, H9, mientras que el subtipo H7N3 se aisló en el Estado de México (Cuevas-Domínguez y González-Guzmán, 2009; Montalvo-Corral y Hernández, 2010; Montalvo-Corral, López-Robles y Hernández, 2011). Por otro lado, en los estados de Sinaloa, Sonora, Chihuahua, Yucatán y Veracruz, se identificaron VIA en 7 de 28 humedales analizados. En esta investigación los anátidos positivos fueron la cerceta de alas verdes (*Anas crecca*), el pato cucharón (*Spatula clypeata*), la cerceta de alas azules (*Spatula discors*), el pato de collar y el pato panadero (*Mareca americana*), además de otras dos especies no anseriformes, con mayor número de positivos en las rutas migratorias del Pacífico y Central. En dicha investigación se identificó el subtipo H5 en una muestra de *M. americana* en Chihuahua (Soriano García, 2009). En patos centinelas se aisló un virus H6N2 rearrreglado en el Estado de México, en un sitio cercano a las Ciénegas de Lerma (Barrón-Rodríguez *et al.*, 2018). En este mismo humedal, se identificó un VIA en muestras de agua en época invernal con una homología del 99% con el subtipo H4N2 de linaje norteamericano aislado a partir de *Spatula discors* (Ornelas-Eusebio *et al.*, 2015).

En aves domésticas se han identificado virus H5N2 y H7N3 de alta y baja patogenicidad (Wainwright, S. y Trevennec, C., 2012; Steffani-Hernández *et al.*, 2016). En 1993 se presentó un brote provocado por VIAAP H5N2, el cual fue aislado en 1994, y que derivó en una extensa campaña de vacunación. Estudios filogenéticos sugirieron que la migración de aves silvestres habría influenciado el brote, debido a que la cepa tuvo mayor similitud con aves silvestres de Estados Unidos (Horimoto *et al.*, 1995). En la actualidad, este subtipo, pero de BP, es endémico en aves domésticas, y se ha propuesto que seguirá circulando sin evolucionar a VIAAP (Steffani-Hernández *et al.*, 2016).

En 2012 surgió un brote de influenza aviar H7N3 (A/Chicken/Jalisco/CPA1/2012/) de AP en gallinas ponedoras en el estado de Jalisco. Se presentaron rearreglos múltiples identificados a partir de la migración de patos silvestres de las rutas migratorias Pacífico y Central desde Estados Unidos. También se identificó que la cepa tuvo una inserción única de ocho aminoácidos en la HA, comparada con otras cepas de AP, además de que *Anas crecca* fue la fuente del virus predecesor (Lu, Lycett y Leigh Brown, 2014). Los análisis filogenéticos de otro estudio relacionado confirmó la inserción de aminoácidos que le permitieron al virus comportarse como VIAAP, pero en contraste, indicó que la especie doméstica con más similitud fue una gallina de guinea (H7N7 de BP) recuperada un año antes en Nebraska, Estados Unidos (Kapczynski *et al.*, 2013). De acuerdo con el reporte de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) del 26 de octubre de 2018, existe una prevalencia actual de este subtipo (H7N3 AP) en granjas de traspatio de los estados de Guanajuato y Querétaro, diezmando poblaciones de gallinas de postura y aves de combate, así como producciones de aves de postura criadas de manera orgánica (Delgadillo Álvarez, 2018a, 2018b). Este subtipo H7N3 AP ha afectado con anterioridad a estados como Aguascalientes, Guanajuato, Oaxaca, Puebla, Jalisco, Chiapas y Veracruz, provocando la muerte a pollos de engorda, reproductores, gallinas de postura, gallos de pelea, aves de traspatio, así como aves silvestres en cautiverio y en una reserva natural como chachalaca (*Ortalis vetula*), zorzal pardo (*Turdus grayi*), loro frente blanca (*Amazona albifrons*) y pavo real común (*Pavo cristatus*) (OIE, 2016a, 2016b, 2018). El control epidemiológico de estos brotes incluyó el despoblamiento, sacrificio sanitario de aves, cuarentena, restricción de movimiento de las aves, sus productos y subproductos. Se reactivó el Dispositivo Nacional de Emergencia de Sanidad Animal (DINESA) a cargo del Servicio Nacional de Sanidad,

Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA) apoyado por la Comisión México Estados-Unidos para la Prevención de la Fiebre Aftosa y otras Enfermedades Exóticas de los Animales (CPA), y se activó el Plan de contingencia para el control y erradicación de influenza aviar de alta patogenicidad. Se establecieron puntos de revisión, vigilancia, cuarentena y aislamiento. Se aplicaron prácticas de bioseguridad como desinfección en instalaciones y vehículos de transporte. También se implementaron sistemas de muestreo en granjas consideradas en riesgo aunado al diagnóstico continuo en laboratorios de bioseguridad nivel 3, así como en laboratorios aprobados. Campañas de vacunación fueron implementadas. Se instó a los productores a participar en una campaña de comunicación para reportar casos positivos a la OIE y se difundió información sobre bioseguridad (FAO, 2012).

Para el caso de influenza porcina, en un estudio de 2008 realizado en la Región del Bajío se determinó la seroprevalencia de VIA de los subtipos H1N1 y H3N2, 81.32% y 38.97% respectivamente (Lara *et al.*, 2012), pero también existen reportes de esos subtipos, junto con el H1N2 (López-Robles *et al.*, 2014; Sánchez-Betancourt *et al.*, 2017). Además, en 2012 se encontró una seroprevalencia del 80.26% para el subtipo H1N2 (Ávalos, 2008). Recientemente, en 2018 se reportó la circulación de tres subtipos, H3N2, H1N1 Y H5N2 en cerdos en los estados de Jalisco, Estado de México, Guanajuato, Michoacán, Hidalgo, Puebla, Sonora, Morelos, Yucatán y Nuevo León. Particularmente, en el Estado de México, se identificó el virus A/swine/Mexico/EdoMexDMZC03/2015(H5N2), y en Guanajuato se aisló en cerdos el virus A/swine/Mexico/GtoDMZC02/2014(H5N2), en donde los autores indicaron transmisión interespecie intacta de pollos hacia cerdos (Saavedra-Montañez *et al.*, 2018). En la Ciudad de México se detectó la presencia de los subtipos H1N1 y H3N2 en granjas de traspatio (Saavedra-Montañez *et al.*, 2013).

Todos estos hallazgos evidencian la circulación continua de VIA en animales de traspatio y en aves silvestres en México. En aves domésticas se han identificado VIABP y VIAAP, así como la identificación de estos virus en anátidos silvestres. De entre estos hallazgos resaltan especialmente los realizados en el Estado de México, que es la región donde se realiza la presente investigación. En algunos casos los virus han resultado del proceso de recombinación, como en las producciones aviares con orígenes silvestres, e incluso se ha identificado la transmisión interespecie en granjas porcinas de traspatio. En este contexto,

se resalta la importancia de monitorear integralmente las interfaces que tienen lugar en áreas de contacto entre esas especies.

Justificación

Existen numerosas publicaciones sobre la circulación y transmisión de virus de influenza que se centran en los factores de riesgo virológicos, pero en México se han desarrollado pocas investigaciones que tomen en consideración otros factores que permitan entender integralmente los procesos que intervienen en la transmisión interespecie de los VIA en zonas de interfaz entre especies silvestres y domésticas (Munoz *et al.*, 2016; Harris *et al.*, 2017; Barrón-Rodríguez *et al.*, 2018). En este sentido, una investigación que incorpore factores antropogénicos, facilitará el entendimiento de los aspectos que participan en la transmisión viral con posibles consecuencias sobre el potencial de transmisión interespecie, principalmente en sistemas en los que conviven frecuentemente diferentes especies de aves como patos domésticos, pollos y gallinas domésticos en sistemas productivos con medidas de bioseguridad escasas (Drosten, 2013). Este estudio proveerá información respecto a la circulación viral en las especies mencionadas en un contexto de interfaz en un área natural protegida, tomando en consideración no solamente una, sino diversas aproximaciones, como diagnóstico molecular, análisis filogenéticos y factores humanos.

Objetivo

Determinar y analizar la diversidad filogenética de virus de influenza A circulantes en aves silvestres y aves de traspatio en una zona de interfaz asociada a la Ciénega de Chignahuapan, municipio de Lerma, Estado de México.

Objetivos específicos:

- Realizar la detección molecular para virus de influenza A de las muestras colectadas.
- Analizar la diversidad filogenética con las secuencias obtenidas.
- Caracterizar la zona de estudio a partir de las granjas de traspatio.

- Detectar transmisión interespecie de virus de influenza A, a partir de la detección molecular y los análisis filogenéticos, considerando las características de las granjas.

Hipótesis

La coincidencia temporal de patos residentes y migratorios en un contexto de interfaz con aves domésticas bajo sistemas de producción de traspatio, así como factores antropogénicos y ecológicos, favorecen la transmisión interespecie de virus de influenza A.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

A lo largo de la Ruta migratoria Central, se encuentran importantes humedales en el Altiplano Central Mexicano donde se localiza el Área de Protección de Flora y Fauna Ciénegas de Lerma. Ésta es un Área Natural Protegida (ANP) compuesta por tres polígonos y está localizada en el Estado de México. Cuenta con una superficie total de 3,023 hectáreas e incluye tres cuerpos de agua separados entre sí, llamados Chignahuapan o Atarasquillo, Chimaliapan o Tultepec y Chiconahuapan o Almoloya, estos tres polígonos se encuentran dentro de un paisaje heterogéneo, dominado por las áreas rurales y urbanas, y por actividades ganaderas y agrícolas. Los cultivos de maíz son los sistemas predominantes, junto con la ganadería ovina, ocupando el 75% del área de la reserva, mientras que las Ciénegas ocupan el 25%, representado por tulares, claros, y otras plantas acuáticas (SEMARNAT, 2002). Las Ciénegas se localizan en los municipios de Lerma, Santiago Tianguistenco, Almoloya del Río, Capulhuac, San Mateo Atenco, Metepec y Texcalyacac, a una altitud media de 2600 msnm (SEMARNAT, 2018). Es considerada un Área de Importancia para la Conservación de Aves Silvestres (AICAS), categoría G-1, por ser importante para la hibernación de aves migratorias (SEMARNAT, 2018) y sitio RAMSAR número 1335, al ser un humedal de importancia internacional (RAMSAR, 2004). Tiene una gran diversidad de flora y fauna acuática (aves, peces, anfibios). Alberga especies amenazadas y conserva poblaciones locales con rangos de distribución restringida (SEMARNAT, 2018). Dentro de esta ANP se han registrado 246 especies de aves tanto residentes como migratorias (Berlanga *et al.*, 2015), de las cuales 15 especies de anátidos migratorios arriban cada invierno a esta región (SEMARNAT, 2018). Una especie endémica considerada como amenazada por la NOM-059-SEMARNAT-2010, es el pato mexicano, *Anas platyrhynchos diazi*, que cohabita con las aves migratorias en dicha área natural protegida. Esta especie residente tiene desplazamientos locales, incluso puede trasladarse de un cuerpo de agua a otro. Habita en la zona norte y centro de México. Adicionalmente, el pato zambullidor, *Oxyura jamaicensis* es otra especie residente que comparte hábitat con los patos migratorios (Colón Quezada, 2012; SEMARNAT, 2018).

El presente estudio se llevó a cabo en la Ciénega Chignahuapan o Atarasquillo que se localiza al norte de los cuerpos de agua del ANP, dentro del municipio de Lerma, Estado de México (19°21'10.64" N, 99°30'18.26" E). En esta ANP se realizan actividades cinegéticas reglamentadas de noviembre a marzo, durante el periodo invernal, periodo en el que las aves migratorias llegan a las Ciénegas de Lerma, y se realizan bajo el esquema de Unidad de Manejo para la Conservación de Vida Silvestre (UMA), llamada "Ejido San Antonio de Los Llanitos". En estas actividades cinegéticas participa gente de la zona, conocidos como "pateros". En un estudio realizado en una población de 113 personas en la misma zona de estudio, se indicó que el 38% se dedicaba a actividades cinegéticas (Ochoa Vallejo, 2010).

Alrededor del ANP se localizan granjas de traspatio con distintas características productivas, por lo que las Ciénegas de Lerma es un sitio ideal que reúne las características de interfaz entre reservorios naturales de los VIA y animales domésticos, al tiempo que reúne factores medioambientales y geográficos de gran interés.

Caracterización de las granjas de traspatio

Para determinar las variables que pueden estar influyendo en la transmisión y/o presencia del VIA se consideraron factores antrópicos y de las granjas de traspatio. De los factores antrópicos reportados en la literatura (cambio de uso de suelo, cambio climático, comercio internacional, agricultura, manejo de granjas de traspatio, mercados de animales vivos, movimiento o comercio de animales, se consideró para este trabajo la información de los tres últimos (Vandegrift *et al.*, 2010; Murray y Daszak, 2013). Se tomaron las coordenadas geográficas de las granjas donde se colectaron las muestras. Se utilizaron los metadatos de las áreas geoestadísticas municipales 2015 (INEGI, 2016) y se plasmaron en un mapa de ubicación de las granjas. Finalmente se calculó el centroide de la Ciénega de Chignahuapan para calcular la distancia entre estas y la Ciénega. Para ello se utilizó el software de sistemas de información geográfica, ArcGis versión 10.5.

Se determinaron las características generales de las unidades de producción de traspatio a partir de los metadatos del censo ganadero más reciente en México, el Censo Agrícola, Ganadero y Forestal 2007 del municipio de Lerma (INEGI, 2007). Asimismo, se aplicó una Encuesta de Bioseguridad de Influenza Aviar elaborado en la Universidad de Davis, EEUU

(responsable, Dra. Beatriz Martínez López, del *Center for Animal Disease Modeling and Surveillance*), y que es una colaboración de la universidad mencionada con las Universidades de California, Iowa, Kansas, y la Universidad Nacional Autónoma de México (Anexo 1) (disponible en <http://www.surveygizmo.com/s3/3362470/Avian-Influenza-Biosecurity-Avian-Survey-Espanol>). Se aplicó a productores que permitieron tomar muestras a sus aves. El cuestionario constó de 89 preguntas y se contó con cinco secciones: datos demográficos de la granja, entorno agrícola, administración de fincas, bioseguridad y contactos, y medicina preventiva. La aplicación del cuestionario tuvo una duración aproximada de 20 minutos.

Colecta de muestras

Se realizó un muestreo de tipo oportunista. Se solicitó autorización a los cazadores para la colección de muestras con hisopo de cloaca de los patos silvestres cazados dentro de las primeras 2 a 6 horas posteriores a la actividad cinegética. Las muestras se colectaron utilizando hisopos estériles (*Alum + viscose swab flow, Deltalab*) y se depositaron en microtubos de 1.5 mL con 1 mL de caldo infusión cerebro corazón como medio de transporte viral (Rose *et al.*, 2006). Las muestras se mantuvieron en refrigeración durante su transporte al laboratorio de la Unidad de Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM. Posteriormente se congelaron durante 24 horas a -20°C, y después se conservaron en ultracongelación a -70°C hasta su procesamiento. La colecta de muestras para este proyecto fue aprobada por el Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales (SICUAE) con protocolo número MC-2017/2-6.

Por otra parte, se identificaron granjas de traspatio que se localizan alrededor de la Ciénega y se tomaron las coordenadas geográficas de cada unidad de producción (Figura 2). Se solicitó autorización a los propietarios para la toma de las muestras con hisopo de cloaca y orofaringe a las aves domésticas que permitieron muestrear.

Sitios de colecta de muestras de aves de traspatio

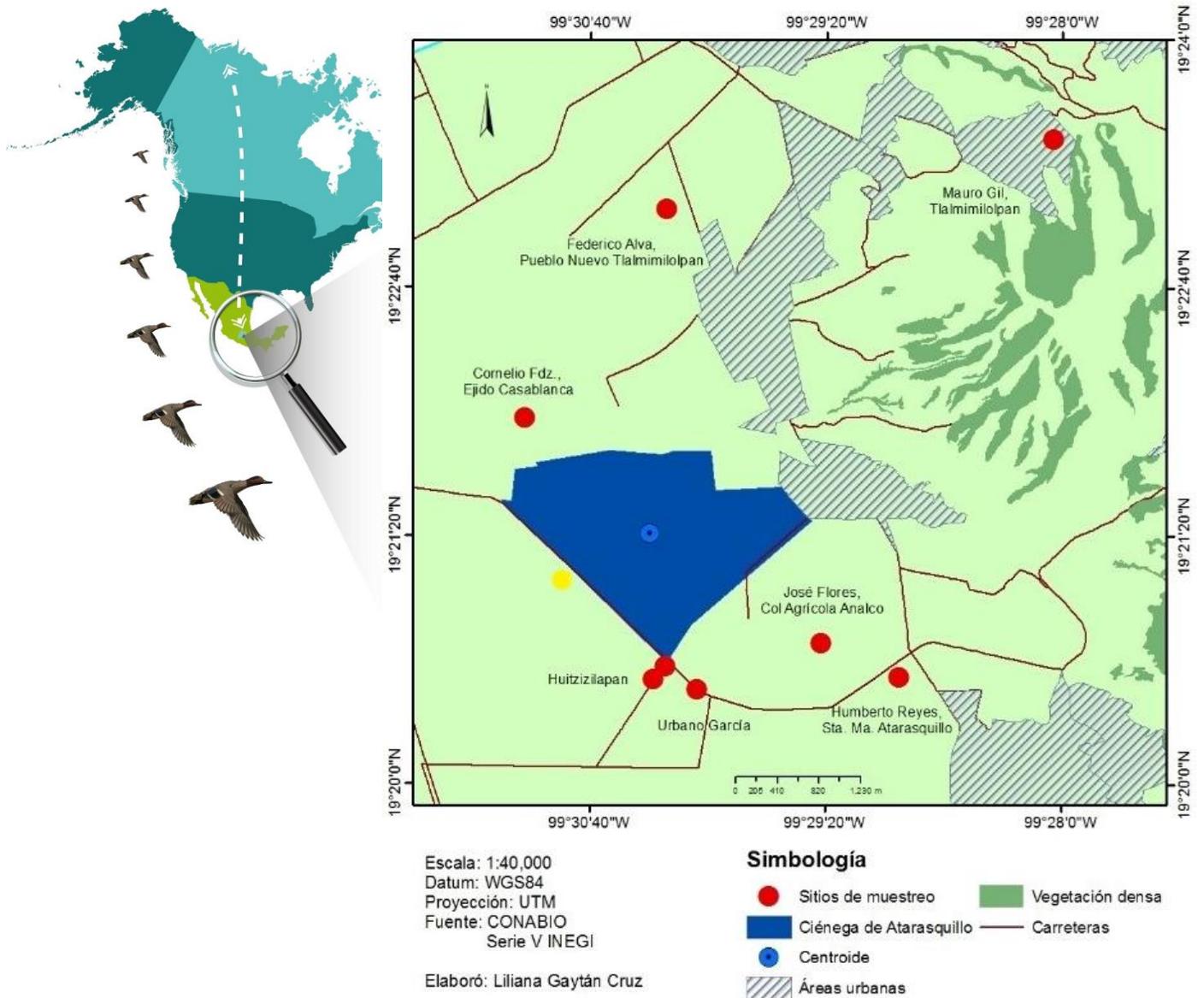


Figura 2. Sitios de colecta de muestras de aves domésticas de traspatio (color rojo) cercanas a la Ciénega de Chignahuapan, Ciénegas de Lerma. El sitio de colecta de muestras de aves silvestres se muestra en color amarillo.

Diagnóstico molecular

Elaboración de agregados

Debido al número elevado de muestras se elaboraron agregados o *pools* de dos a cinco muestras procedentes de los aves silvestres y domésticas, considerando fecha de colecta, especie, y en la mayoría de las especies también se agruparon por sexo. Para las muestras de aves domésticas además se tomó en consideración: fin zootécnico y granja de procedencia. Las muestras de aves con signos respiratorios durante la toma de la muestra se procesaron de forma individual. El resto de la muestra individual se colectó sin tomar el sedimento ni el hisopo y se colocó en un microtubo estéril que se refrigeró y posteriormente se preservó en ultracongelación.

Extracción de ácidos nucleicos

Las muestras se descongelaron paulatinamente, se centrifugaron a 2500 rpm (1780.2xg) durante un minuto con el propósito de que se sedimentaran los detritos. En una campana de flujo laminar se obtuvieron 100 µL del sobrenadante de cada muestra y se colocaron en un mismo microtubo de 1.5 mL. De las muestras que se procesarían de manera individual se obtuvieron 200 µL. Los agregados se mantuvieron en refrigeración.

Las muestras en agregado se procesaron utilizando un kit comercial de extracción y purificación automatizada de ARN viral. El kit utilizado fue *Cador Pathogen 96 QIAcube HT Kit* de *Qiagen*. La combinación de los componentes y la incorporación de las muestras se realizó en una campana de flujo laminar con una base de hielo para mantener las condiciones de refrigeración y siguiendo el protocolo del fabricante. Las muestras se procesaron en el Laboratorio de la Unidad de Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia en los equipos automatizados “*QIAcube HT*” y “*QIAgility*” de *Qiagen*.

RT-PCR en Tiempo Real

Para la amplificación de los ácidos nucleicos obtenidos en el paso anterior se realizó el ensayo de Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcripción Reversa en Tiempo Real (qRT-PCR), para el cual se utilizó el kit comercial “*Swine Influenza Virus RNA Test Kit*,

VetMAX-Gold SIV Detection Kit® de *Life Technologies*, número de catálogo 4415200 (Ma *et al.*, 2014), empleando como blanco de amplificación el gen M o gen de matriz del virus de influenza A, que es el gen conservado para la detección del VIA. El kit incluye *buffer*, enzimas, *primers*, control positivo, control interno y control negativo (NTC). El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se utilizó un termociclador *Rotor-Gene Q* de *Qiagen* con los siguientes ajustes para la amplificación de ARN viral:

Fase	Repeticiones	Temperatura	Tiempo
Transcripción reversa	1	48 °C	10 min
Inactivación RT/desnaturalización inicial	1	95 °C	10 min
Amplificación	40	95 °C 60 °C	15 seg 45 seg

Se consideraron como positivas las muestras con un valor de CT menor a 38, valor similar que ha sido utilizado en estudios previos (Verhagen *et al.*, 2017). Sin embargo, se considera que mientras más bajos sean los valores de CT de las muestras analizadas, la cantidad de copias genómicas será mayor. El rango de sospechosos fue un valor de CT de 38 a 40. Valores de CT no detectados se consideraron negativos. Para el análisis de los resultados se utilizó el software *Rotor-Gene Q Software 2.3.1.49*. Posteriormente, para identificar las muestras positivas individuales a partir de los agregados, de forma individual se realizó nuevamente la extracción de ácidos nucleicos y la qRT-PCR con 200 µL de cada muestra original.

Aislamiento viral

Replicación viral de muestras positivas a VIA identificados en patos silvestres

Con el objetivo de aislar los VIA de las muestras positivas detectadas por qRT-PCR se realizaron inoculaciones en embriones de pollo libres de patógenos específicos de 9 a 11 días de edad bajo el siguiente procedimiento:

1. En una campana de flujo laminar se filtraron las muestras utilizando un filtro de 0.2 micras.
2. Tras la llegada de los embriones se revisó su viabilidad, se identificó la cámara de aire que se trazó con lápiz y se les dejó en incubación a 37°C.
3. Pasando 24 horas de incubación, se realizó la inoculación en dos huevos, a cada uno se le inocularon 200 µL por muestra vía cavidad alantoidea a un ángulo de 90° con una jeringa de insulina de aguja desmontable (27G x 13mm), previa desinfección del cascarón con alcohol al 70%. El orificio de inoculación se cubrió con pegamento blanco de manera inmediata.
4. Una vez realizada la inoculación, los embriones permanecieron en incubación durante 72 horas.
5. Se revisó la viabilidad de los embriones a las 24, 48 y 72 horas.
6. Los embriones identificados como muertos a las 24 h se descartaron al considerados afectados por traumatismo.
7. En el caso de que los embriones hubiesen muerto a las 48 hr, se colectó líquido alantoideo.
8. Para la colección del líquido alantoideo se desinfectó con alcohol al 70% la cámara de aire y se cortó con tijeras estériles. Se utilizaron puntas estériles de 1000 µL con las que se depositó el líquido obtenido en tubos cónicos estériles tipo falcon de 15 mL, los cuales se refrigeraron. Posteriormente, se centrifugó a 3500 rpm (11904.4 x g) a 4°C durante 10 minutos.
9. A las 72 h se colectó el líquido alantoideo de los embriones restantes.

Se realizaron dos pases adicionales. En el primer pase se inocularon dos huevos por muestra con el líquido alantoideo obtenido previamente. El segundo pase se inocularon tres huevos por muestra y cuatro para las muestras que hubiesen tenido un título bajo.

Para comprobar la presencia del virus, el líquido alantoideo obtenido se tituló por medio de la técnica Hemoaglutinación en microplaca, utilizando microplacas de 96 pozos en forma de "U". Para ello se depositaron 50µL de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) a cada pozo. Se añadieron 50 µL de líquido alantoideo en el pozo uno, realizando posteriormente diluciones dobles seriadas desde 1:2 hasta 1:4096. Se agregaron 50 µL de eritrocitos de gallina al 0.5 % a todos los pozos. La lectura se realizó a los 30 minutos tomando en cuenta el control de eritrocitos. El título se determinó en los pozos en los cuales se observó

hemoaglutinación, es decir, la unión del antígeno (VIA) con los eritrocitos. La titulación se consideró como positiva a partir de un título de 1:16 UHA (Unidades Hemoaglutinantes). Con el resto del líquido colectado considerado como positivo se realizaron alícuotas y se conservó en ultracongelación a -70°C.

Secuenciación de ácidos nucleicos

Las muestras determinadas como positivas a VIA en la titulación viral del líquido alantoideo se enviaron para secuenciación del genoma completo al Laboratorio de la Unidad de Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM con la técnica de secuenciación de nueva generación, que utiliza secuenciación por semiconducción cuyo equipo no requiere fluorescencia ni sistemas de cámara de barrido (*Ion Torrent, Life Technologies*). El procedimiento consistió en la construcción de librerías, la preparación del templado y la corrida de la secuencia. Se construyeron librerías con el kit *Ion Plus Fragment Library (Life Technologies)*, siguiendo el protocolo de fragmentación del ARN total con *Biorruptor Sonication System*. Posteriormente el ADN se purificó con el kit *Agencourt AMPure XP*. Se confirmó la obtención de los fragmentos de ADN de 200 pares de bases con el kit, software y equipo *Agilent*. Después de la obtención de las librerías se elaboró el templado con los kits *Ion OneTouch 2 System* y *Ion PGM Hi-Q OT2 kit* siguiendo los protocolos del fabricante (*Life Technologies*). Con un chip se realizó la corrida de la secuencia con el kit *Ion PGM Hi-Q Sequencing*. Las lecturas fueron alineadas y ensambladas con *AssemblerSPAdes v5.4.0*. Se utilizó una profundidad de 300X, recomendada en esta tecnología para virus con altas tasas de mutación (Liu *et al.*, 2012; Martínez Bautista, 2018). Las secuencias de nucleótidos se editaron eliminando los nucleótidos anteriores al codón de inicio ATG, posteriormente se almacenaron en formato FASTA para su posterior análisis.

Análisis filogenéticos

Se realizaron análisis filogenéticos basados en datos de secuencias de genomas completos de los VIA. Mediante la herramienta en línea para la comparación de secuencias, NCBI-BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), desarrollado por el *National Center for Biotechnology Information* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), se seleccionaron las secuencias con mayor similitud de cada uno de los ocho genes o segmentos del VIA. Para

cada gen se tomaron las 25 secuencias del GenBank con el mayor porcentaje de identidad. Con dichas secuencias se realizaron alineamientos de ácidos nucleicos con el programa *Molecular Evolutionary Genetic Analysis* (MEGA-X) usando el algoritmo Muscle que posteriormente se ajustaron de manera manual. Usando los alineamientos de secuencias de nucleótidos, se generaron árboles filogenéticos con los métodos estadísticos de Máxima Verosimilitud empleando el modelo de sustitución de nucleótidos con sitios invariables *Gamma Distribution Parameter* (GTR+I), búsquedas con el método heurístico *Subtree Pruning & Regrafting* (SPR) y el método de Bootstrap como prueba de la filogenia, con 1000 réplicas (Wohl, Schaffner and Sabeti, 2016). Se seleccionó la secuencia de un virus porcino (*A/swine/Korea/C13/2008(H5N2)*) como grupo externo para el genoma del virus relacionado con patos silvestres, H5N2 (Wohl, Schaffner y Sabeti, 2016). Se calcularon las distancias genéticas por pares con el programa MEGA, así como el porcentaje de identidad de nucleótidos con el programa libre en línea *Sequence Identity & Similarity* (SIAS) de la Universidad Complutense de Madrid, España (<http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html>).

RESULTADOS

Caracterización de las granjas

Factores antropogénicos

Se identificó la influencia humana en la movilización y manipulación de aves silvestres y animales domésticos. Durante la temporada cinegética se realiza la movilización de los especímenes cazados por parte de los cazadores y de los “pateros” e incluso en algunas ocasiones los transportan a sus hogares para consumo. En el área de la UMA, los trabajadores o “pateros” (incluyendo niños, mujeres y hombres) manipulan las aves cazadas, las despluman y/o las evisceran sin medidas de higiene básicas como lavado de manos, dejando restos de las carcasas en el ambiente y los transportan a sus hogares para consumo. Con respecto a las producciones de traspatio, los productores indicaron que existe un constante movimiento de aves de pelea (e.g. gallos) para esta actividad dentro y fuera de la comunidad. Además, también movilizan cerdos entre distintas granjas con fines reproductivos a otras granjas. Los propietarios indicaron sí consumir los patos silvestres cazados, pero no participar en mercados de animales vivos.

Características de las granjas

1. Características generales

La extensión de las granjas midió desde los 6 m² hasta los 5600 m². En las granjas muestreadas, y en general del municipio de Lerma, se encuentran diversas especies de aves con distintos fines zootécnicos: *Gallus gallus domesticus* (gallinas, gallos, gallos de pelea y pollos de engorda), *Meleagris gallopavo* (guajolotes), *Cairina moschata*, *Anas platyrhynchos domesticus* (patos) y *Anser anser domesticus* (gansos). Asimismo, diversas especies de animales domésticos conviven con estas aves (Cuadro 1). En las ocho granjas existe una casa donde habitan los productores, las aves pastorean al aire libre todo el año, a excepción de una granja en donde no salen las aves en época de siembra (granja 6). La mortalidad es menor al 1%. Los propietarios confirmaron que sus terrenos son susceptibles

de inundación en época de lluvias intensas, excepto la granja más lejana a la Ciénega de Chignahuapan (granja 5).

2. Entorno agrícola

Todas las granjas muestreadas tienen fácil acceso a vías públicas y cercanía de campos de cultivo menor a 5 metros de distancia. Están ubicadas desde 1.3 Km a 4.4 Km de distancia del centroide de la Ciénega de Chignahuapan (Figura 2, Cuadro 1). Entre granjas de traspatio, la cercanía es mayor, con menos de 1 Km de distancia de una granja a otra en cinco casos.

3. Administración de fincas.

De acuerdo con la base de datos del INEGI, la población y venta predominante de aves domésticas en el municipio de Lerma fueron las gallinas y los pollos de engorda, debido a la existencia de una granja avícola industrial. En la zona también se cuenta con producción de gallos de pelea, representando la segunda especie en cuanto a aves vendidas, con un constante movimiento de estas aves para esta actividad dentro y fuera de la comunidad. Además, también se movilizan cerdos entre distintas granjas con fines reproductivos. La obtención de sus aves es mediante repoblación, sin embargo, un productor de gallos de pelea (granja 1) adquiere sus aves en el municipio de Toluca, Estado de México, a 25 Km de distancia.

4. Bioseguridad y contactos.

Las aves silvestres que los propietarios identificaron cerca a sus producciones de traspatio fueron: 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*), otras aves comunes como gorriones (*Passer domesticus*), así como patos sin especificar de qué especie. También reportaron haber observado serpientes (*Thamnophis spp*), tlacuaches (*Didelphis virginiana*) y cacomixtles (*Bassariscus astutus*) (Cuadro 1). Las cercas de las fincas no impiden la entrada de aves y otros animales silvestres. Cuatro propietarios indicaron que aves silvestres tienen acceso a los comederos y bebederos de las aves domésticas, y comentaron tener presencia de roedores como ratones y ratas. Cinco indicaron que la fuente de agua para las aves de traspatio la obtienen de pozos o suministros municipales y no cuentan con cuerpos de agua dentro de sus granjas, además de que no limpian las gallineras con el líquido, tampoco desinfectan sus instalaciones. Indicaron permitir la

entrada de visitantes, a los cuales no se les provee de botas ni ropa de trabajo, así como la entrada de vehículos a sus granjas sin ser desinfectados. Existe una red de contacto entre granjas con un mismo médico veterinario, ya que cinco granjas son atendidas por él (Cuadro 1).

5. Medicina preventiva

El INEGI reportó que en el municipio de Lerma se llevan a cabo medidas preventivas de vacunación de las aves, pero no se especifica la vacunación contra influenza aviar. De las ocho granjas muestreadas, solamente tres indicaron haber aplicado en alguna ocasión vacunas a las aves, excepto para influenza. Esta falta de esquemas de vacunación es debida a que la instancia que indicaba los criterios de vacunación para influenza aviar es el SENASICA, órgano desconcentrado de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) (actualmente Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, SADER) (SAGARPA, 2011). Por otro lado, los propietarios indicaron no realizar pruebas diagnósticas de enfermedades en sus animales.

En el Cuadro 1 se muestra información adicional sobre las características por cada sistema de traspatio.

Cuadro 1. Características de las granjas de aves domésticas de traspatio

Granja	Distancia a la Ciénega (m)**	Vacunación	Comparten MVZ	Otros animales de granja	Presencia de fauna silvestre o roedores	Participa en cacería de patos silvestres	Comparten cerdo reproductor
1 *	1703	NC, cólera, marek	No	Porcinos, ovinos, bovinos	Patos, garcetas, garzas, zanates, cernícalos, roedores	No	No
2	2000	Triple aviar	Sí	Porcinos, perros	Ibis, aves no acuáticas	Sí	Sí
3	1617	Ausente	NI	Bovinos, perros, gatos	Aves no acuáticas	Sí	No
4	2849	Ausente	Sí	Porcinos, conejos	Aves no acuáticas	No	Sí
5	5585	Triple aviar a los 3 y 6 meses	Sí	Porcinos, perros	Aves no acuáticas, roedores, cacomixtles	NI	Sí
6	3217	Ausente	Sí	Porcinos, bovinos, ovinos, perros, equinos	Patos, gansos, Roedores, garzas, tordos negros	No	Sí
7	1329	Ausente	NI	Ovinos, gatos	Patos, aves no acuáticas	No	No
8	1448	Ausente	Sí	Porcinos, ovinos	Patos silvestres, lechuzas, búhos, zopilotes	No	Sí

Características principales de las ocho granjas en las que se tomaron muestras a aves domésticas.

* Granja de aves de producción de aves de combate.

** Distancia de la granja al centroide de la Ciénega. NI: No posee información.

Muestras colectadas

Aves silvestres

Se colectaron 597 muestras de cloaca de noviembre 2016 a febrero 2017 (Figura 3), con las que se realizaron 147 *pools* o agregados. Durante la toma de muestras se realizó la identificación de diez especies, siete de ellas fueron patos nadadores: *Anas acuta*, *Anas crecca*, *Anas platyrhynchos diazi*, *Mareca americana*, *Mareca strepera*, *Spatula discors*, *Spatula clypeata*, y *Spatula cyanoptera*; y dos fueron patos buceadores: *Aythya collaris* y *Oxyura jamaicensis*. Estas diez especies representan el 66.6% de los 15 anátidos que se encuentran en la lista AICAS de Lerma (Berlanga *et al.*, 2015; CONABIO, 2018). En el cuadro 2 se enlistan el número respectivo de muestras por especie. Se colectó un mayor número de muestras al inicio de la época migratoria, sobre todo entre noviembre y diciembre, disminuyendo considerablemente en el mes de enero.

Cuadro 2. Número de muestras obtenidas de 10 especies de patos silvestres

Especies de patos	Nombre común	Nombre común en inglés	Muestras colectadas
Nadadores			
<i>Anas acuta</i>	Pato golondrino	Northern Pintail	43
<i>Anas crecca</i>	Cerceta de alas verdes	Green-winged Teal	201
<i>A. platyrhynchos diazi</i>	Pato mexicano	Mexican duck	9
<i>Mareca americana</i>	Pato panadero	American Wigeon	41
<i>Mareca strepera</i>	Pato cola prieta	Gadwall	47
<i>Spatula discors</i>	Cerceta de alas azules	Blue-winged Teal	210
<i>Spatula clypeata</i>	Pato cucharón	Northern Shoveler	30
<i>Spatula cyanoptera</i>	Cerceta canela	Cinnamon Teal	10
Zambullidores			
<i>Aythya collaris</i>	Pato boludo negro	Ring-necked duck	3
<i>Oxyura jamaicensis</i>	Pato tepalcate	Ruddy duck	3
Total de muestras			597

Aves domésticas

Se colectaron 206 muestras con hisopo cloacal y orofaríngeo procedentes de 103 aves domésticas. En total se obtuvieron 62 pools o agregados. Se lograron obtener muestras de cinco especies: *Gallus gallus domesticus*, *Meleagris gallopavo*, *Cairina moschata*, *Anas platyrhynchos domesticus* y *Anser sp* (Cuadro 3). El periodo de la toma de muestras fue del 3 de diciembre de 2016 al 27 de mayo de 2017 (Figura 3).

Cuadro 3. Muestras colectadas de aves de traspatio por granja

Fecha	# de granja	Población total	GA	GO	PO	GU	P	G	Total por granja
03/12/2016	1	500	11						11
19/02/2017	2	15	3			1			4
12/03/2017	3	100	5	3		8	3		19
25/03/2017	4	7	6	1					7
13/05/2017	5	35	19						19
06/05/2017	6	15	7	1		1	2	1	12
06/05/2017	7	100	16	1					17
27/05/2017	8	22	6	1	6	1			14
Total por especie			73	7	6	11	5	1	103

GA: gallinas, GO: gallos; PO: pollos de engorda; GU: guajolotes; P: patos; G: gansos

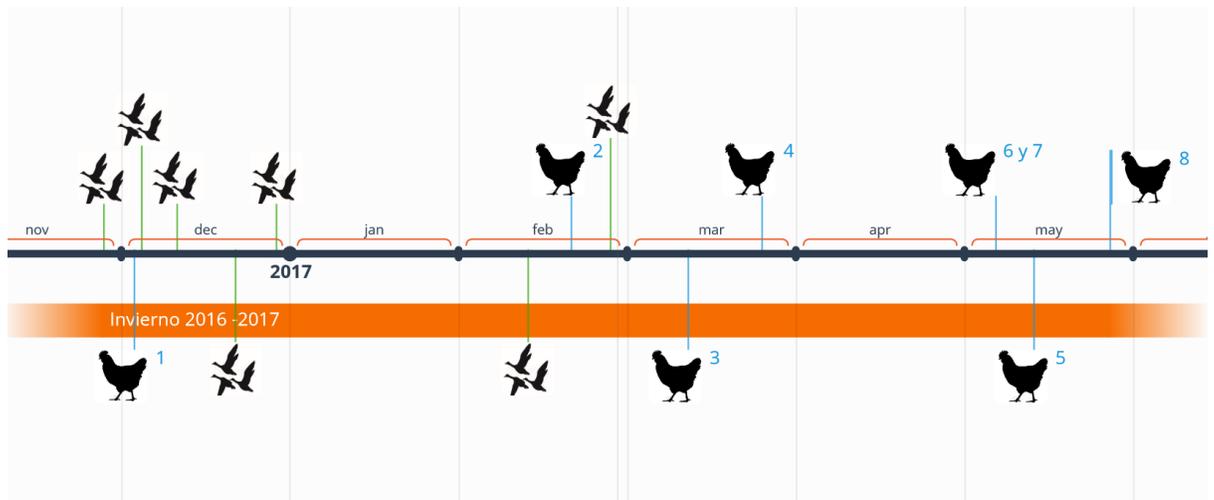


Figura 3. Línea de tiempo de muestreos de aves silvestres y domésticas. El periodo de colecta fue de noviembre de 2016 a mayo de 2017. Los números en el índice superior de las figuras de aves domésticas indican el número de granja.

Diagnóstico molecular

Patos silvestres

20 de los 147 agregados o *pools* procesados resultaron positivos a VIA mediante qRT-PCR. Se realizó nuevamente qRT-PCR a cada muestra individual de los 20 agregados. El resultado fueron 22 muestras individuales positivas a VIA mediante qRT-PCR correspondientes a tres especies de patos nadadores migratorios: *Anas crecca*, *Spatula discors*, *S. clypeata*, y una especie residente: *A. platyrhynchos diazi* (Figura 4). *A. crecca* y *S. discors* fueron las especies predominantes en cuanto a número de muestras colectadas y a detección de VIA. La frecuencia general de VIA en patos silvestres en este estudio fue de 3.68%. La mayoría de las muestras positivas fueron colectadas entre los meses de diciembre de 2016 y enero de 2017. En el cuadro 4 se muestran los valores de CT de cada muestra positiva a qRT-PCR.

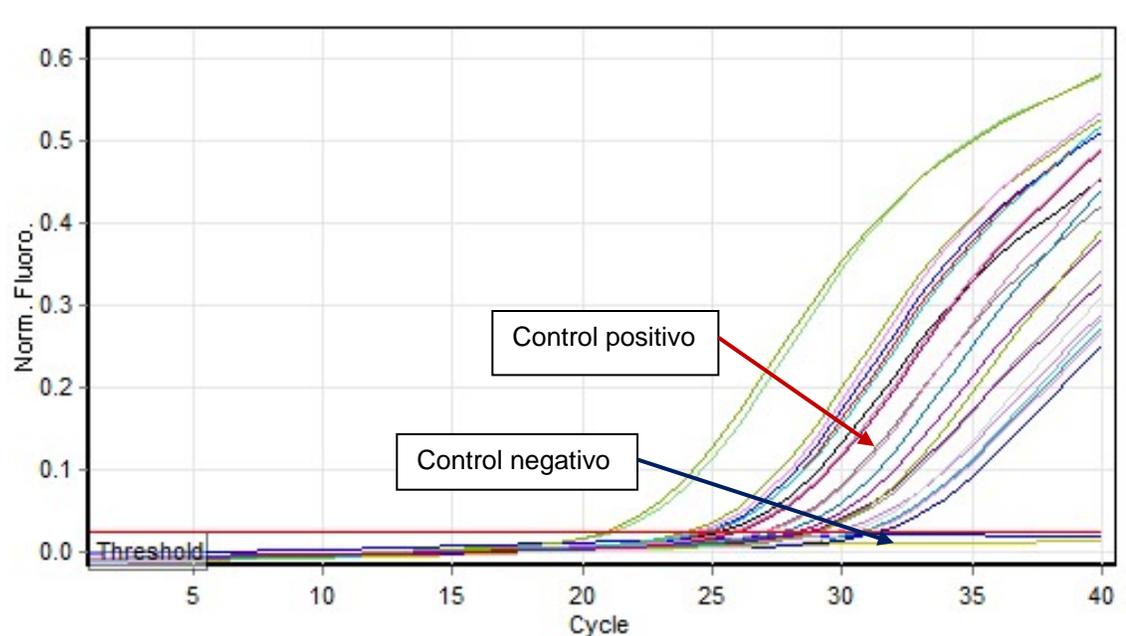


Figura 4. Gráfica de qRT-PCR de las 22 muestras positivas a VIA.

Cuadro 4. Anátidos positivos a virus de influenza A mediante qRT-PCR

No.	Fecha colecta	Especie	Sexo	Valor CT
1	27/11/2016	<i>Anas crecca</i>	H	25.28
2	04/12/2016	<i>Anas crecca</i>	M	28.18
3	11/12/2016	<i>Spatula discors</i>	M	29.57
4	11/12/2016	<i>Anas p. diazi</i>	M	20.8
5	22/01/2017	<i>Anas crecca</i>	H	30.54
6	22/01/2017	<i>Anas crecca</i>	M	31.31
7	22/01/2017	<i>Spatula discors</i>	H	30.19
8	22/01/2017	<i>Spatula discors</i>	M	24.75
9	26/02/2017	<i>Spatula clypeata</i>	H	27.73

Aves domésticas

De los 62 *pools* o agregados, es decir, 103 muestras orofaríngeas y cloacales tomadas de aves de traspatio (gallinas, gallos, pollos de engorda, guajolote, patos y un ganso), todos resultaron negativos a VIA mediante el ensayo de qRT-PCR debido a que no se detectaron valores de CT de las muestras.

Aislamiento viral y secuencias

En el primer aislamiento se obtuvo una muestra con título positivo correspondiente a la subespecie *A. platyrhynchos diazi*, con número de identificación 377, el resto de las muestras resultaron negativas.

En el primer pase se obtuvieron 7 muestras positivas adicionales a la primera inoculación. *A. crecca* (80, 169, 456, 465), *S. discors* (478, 507), *S. clypeata* (613), y la muestra 377 obtuvo un título viral mayor.

En el segundo pase se identificó una muestra más como positiva a la titulación viral, *S. discors* (322).

En total se obtuvieron nueve aislamientos de VIA tras el cultivo en embriones de pollo.

Secuenciación y análisis filogenéticos

Se obtuvieron secuencias de nucleótidos de los ocho genes completos de nueve muestras distintas. Se identificaron tres subtipos virales H5N2, H3N2 y H1N1. Uno de ellos de origen silvestre (H5N2) (Anexo 1) y 3 relacionados a porcinos domésticos (H5N2, H3N2 y H1N1). La secuencia que presentó similitud con subtipos silvestres fue colectada del pato residente, es decir, el pato mexicano *A. platyrhynchos diazi*; las ocho secuencias restantes se colectaron a partir de aves migratorias.

Secuencias relacionadas con subtipos silvestres

Los segmentos o genes de los VIA aislados a partir del pato mexicano, al cual se le nombró *A/Mexican_duck/Mexico/LermaUIFMVZ377/2016_(H5N2)*, están relacionados con subtipos de linaje norteamericano. Inicialmente, en el alineamiento realizado con el programa BLAST en línea se identificaron seis subtipos diferentes. Las secuencias se subieron a la plataforma GenBank.

Se muestran los árboles filogenéticos construidos mediante el algoritmo de Máxima Verosimilitud de cada uno de los ocho genes del virus aislado a partir de *Anas platyrhynchos diazi* (Figura 5 A-H). Mediante el cálculo de distancias genéticas y porcentaje de identidad de nucleótidos se corroboraron los subtipos con mayor similitud a las secuencias de cada uno de los genes obtenidos mediante secuenciación en este estudio y observados en la topología de los árboles filogenéticos. Con estos datos se identificó principalmente la ruta migratoria del Pacífico en seis de los ocho genes del virus.

A

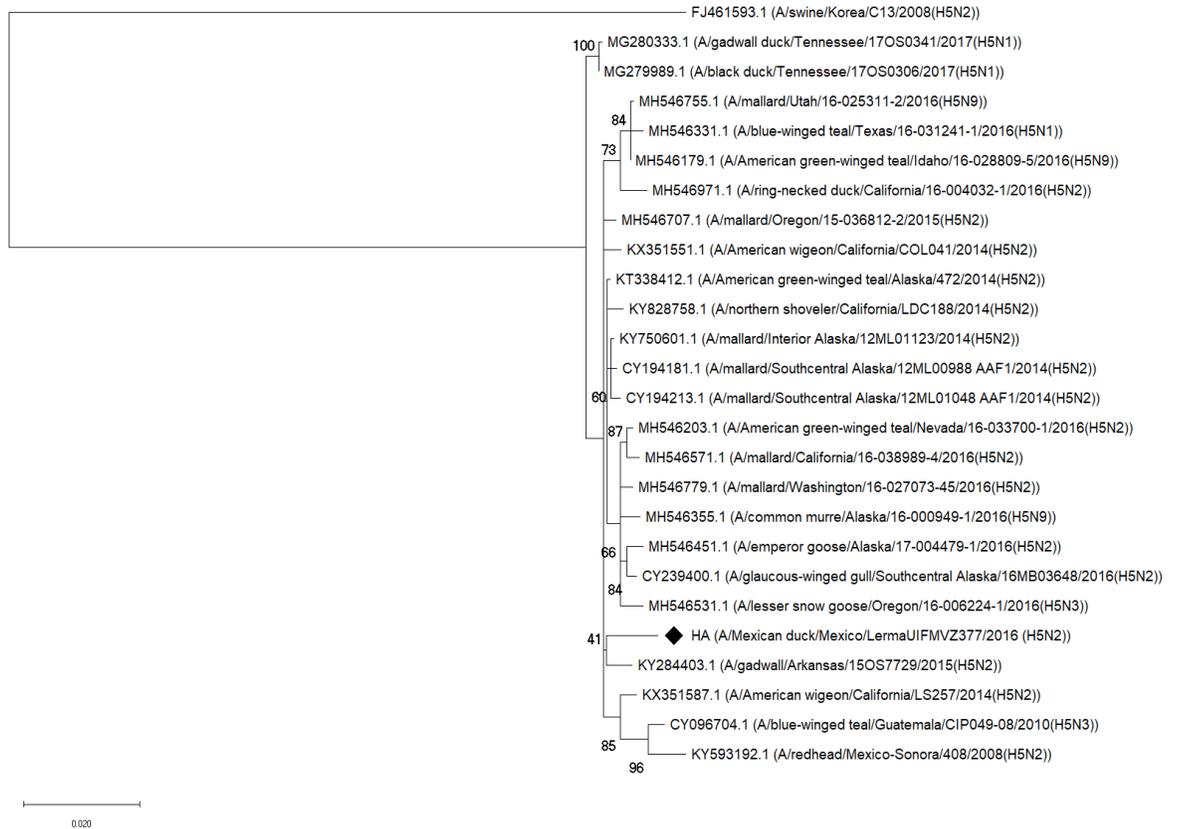


Figura 5 A. Árbol filogenético construido con el algoritmo Máxima verosimilitud del gen HA del VIA aislado a partir de *Anas platyrhynchos diazi*. Análisis filogenético molecular por el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo GTR. Se realizaron búsquedas con el método heurístico *Subtree Pruning & Regrafting* (SPR) y como prueba de la filogenia se utilizó el método de Booststrap, con 1000 réplicas. El porcentaje de los árboles en los cuales los genes asociados se agrupan se muestra al lado de los brazos. El análisis involucró 25 secuencias de nucleótidos. La secuencia identificada en este estudio está indicada con el rombo negro. Como grupo externo se incorporó la secuencia de nucleótidos “Influenza A virus (A/swine/Korea/C13/2008(H5N2)) segment 4 hemagglutinin (HA) gene, complete cds”, número de acceso FJ461593.1.

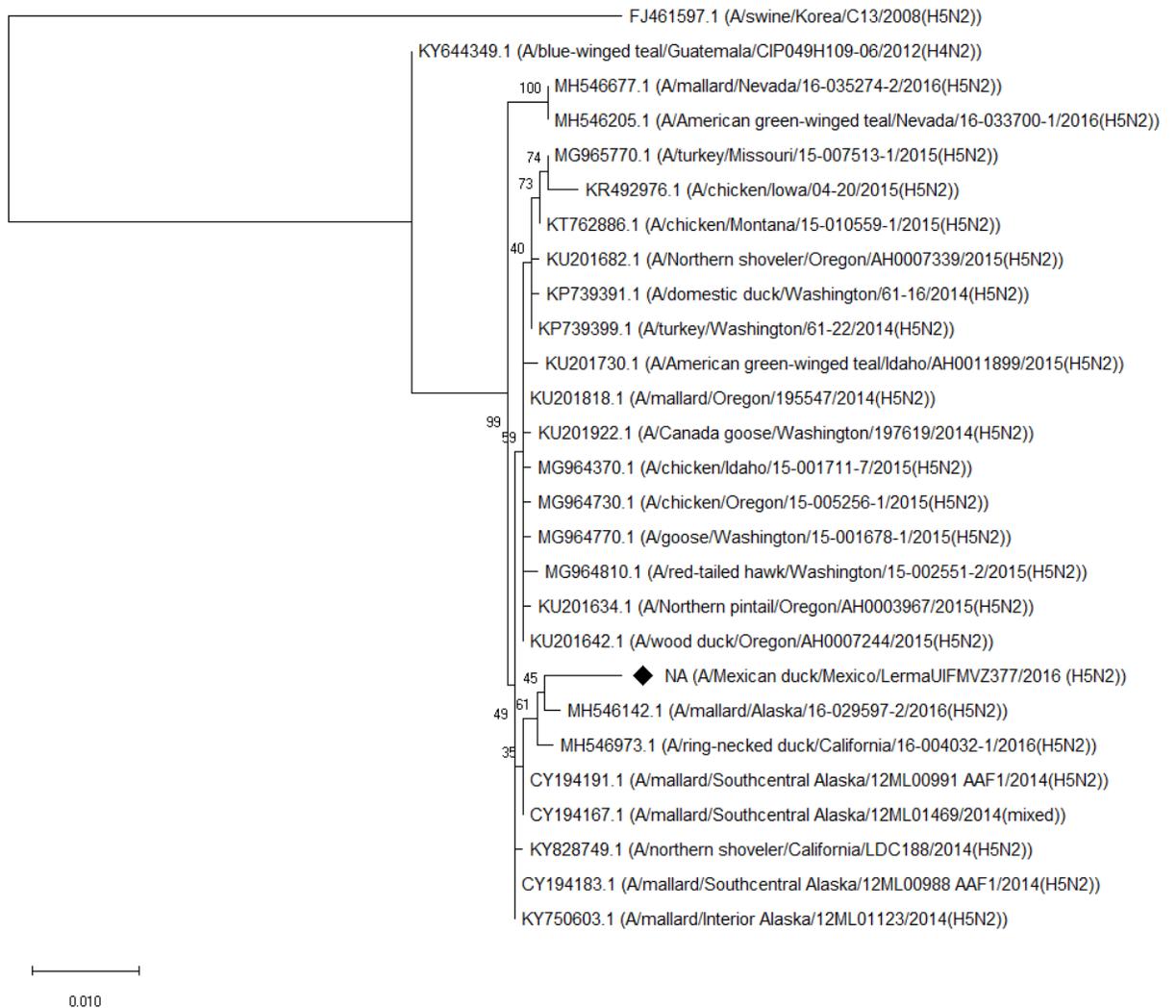
B

Figura 5 B. Árbol filogenético construido con el algoritmo Máxima verosimilitud del gen NA del VIA aislado a partir de *Anas platyrhynchos diazi*. Análisis filogenético molecular por el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo GTR. Se realizaron búsquedas con el método heurístico *Subtree Pruning & Regrafting* (SPR) y como prueba de la filogenia se utilizó el método de Booststrap, con 1000 réplicas. El porcentaje de los árboles en los cuales los genes asociados se agrupan se muestra al lado de los brazos. El análisis involucró 25 secuencias de nucleótidos. La secuencia identificada en este estudio está indicada con el rombo negro. Como grupo externo se incorporó la secuencia de nucleótidos “Influenza A virus (A/swine/Korea/C13/2008(H5N2)) segment 4 hemagglutinin (HA) gene, complete cds”, número de acceso FJ461593.1.

C

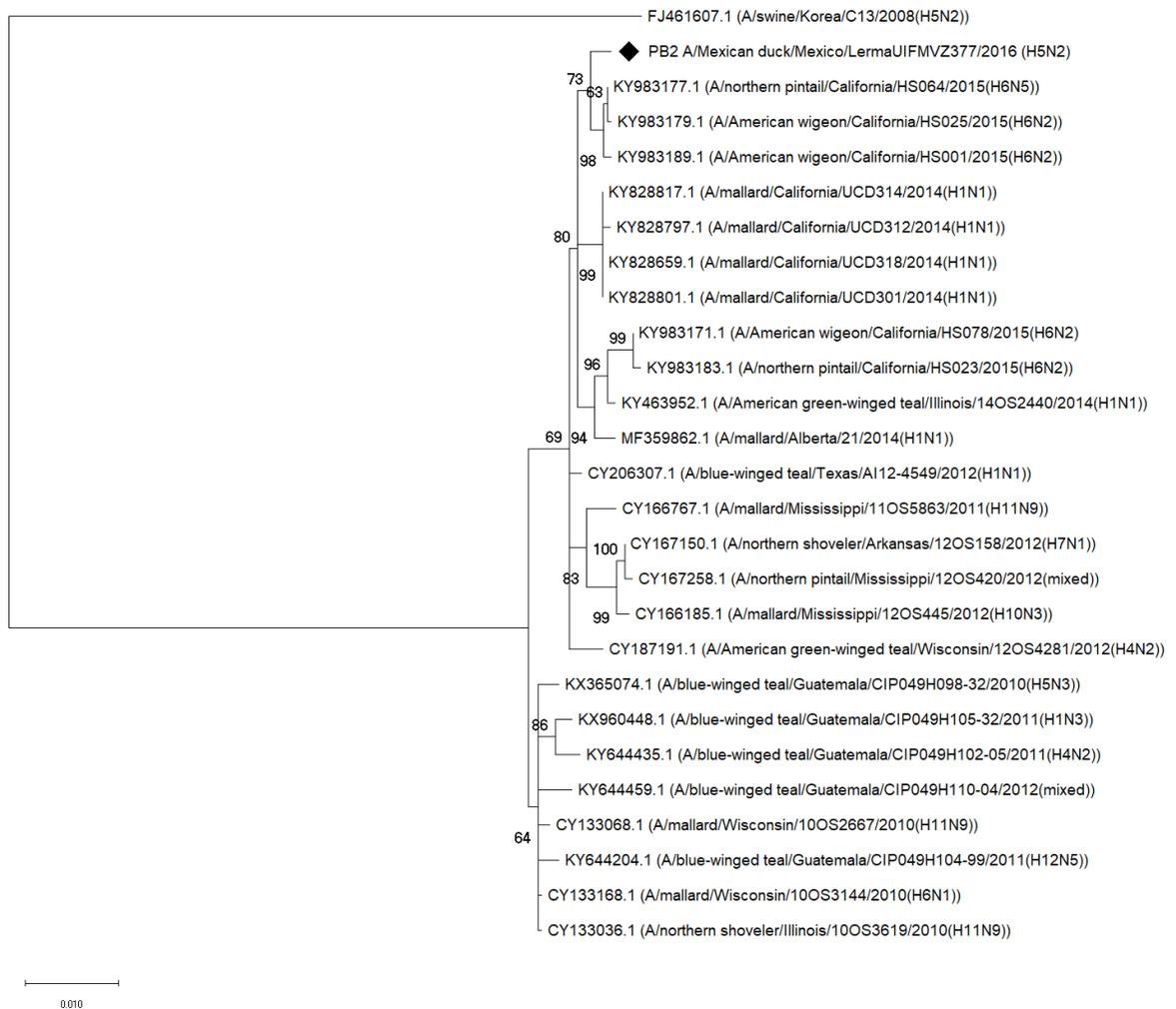


Figura 5 C. Árbol filogenético construido con el algoritmo Máxima verosimilitud del gen PB2 del VIA aislado a partir de *Anas platyrhynchos diazi*. Análisis filogenético molecular por el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo GTR. Se realizaron búsquedas con el método heurístico *Subtree Pruning & Regrafting* (SPR) y como prueba de la filogenia se utilizó el método de Booststrap, con 1000 réplicas. El porcentaje de los árboles en los cuales los genes asociados se agrupan se muestra al lado de los brazos. El análisis involucró 25 secuencias de nucleótidos. La secuencia identificada en este estudio está indicada con el rombo negro. Como grupo externo se incorporó la secuencia de nucleótidos “Influenza A virus (A/swine/Korea/C13/2008(H5N2)) segment 4 hemagglutinin (HA) gene, complete cds”, número de acceso FJ461593.1.

D

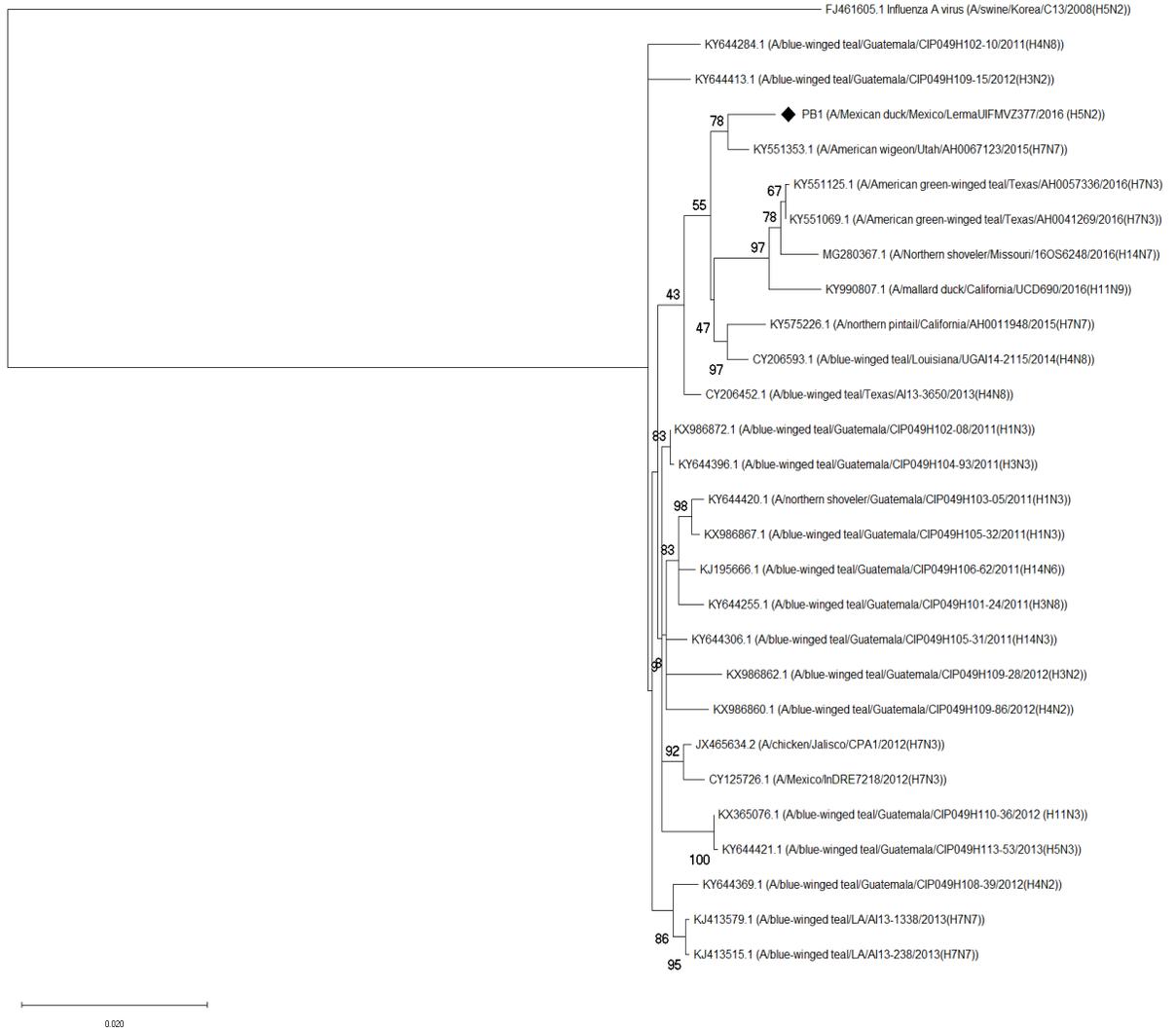


Figura 5 D. Árbol filogenético construido con el algoritmo Máxima verosimilitud del gen PB1 del VIA aislado a partir de *Anas platyrhynchos diazi*. Análisis filogenético molecular por el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo GTR. Se realizaron búsquedas con el método heurístico *Subtree Pruning & Regrafting* (SPR) y como prueba de la filogenia se utilizó el método de Booststrap, con 1000 réplicas. El porcentaje de los árboles en los cuales los genes asociados se agrupan se muestra al lado de los brazos. El análisis involucró 25 secuencias de nucleótidos. La secuencia identificada en este estudio está indicada con el rombo negro. Como grupo externo se incorporó la secuencia de nucleótidos “Influenza A virus (A/swine/Korea/C13/2008(H5N2)) segment 4 hemagglutinin (HA) gene, complete cds”, número de acceso FJ461593.1.

E

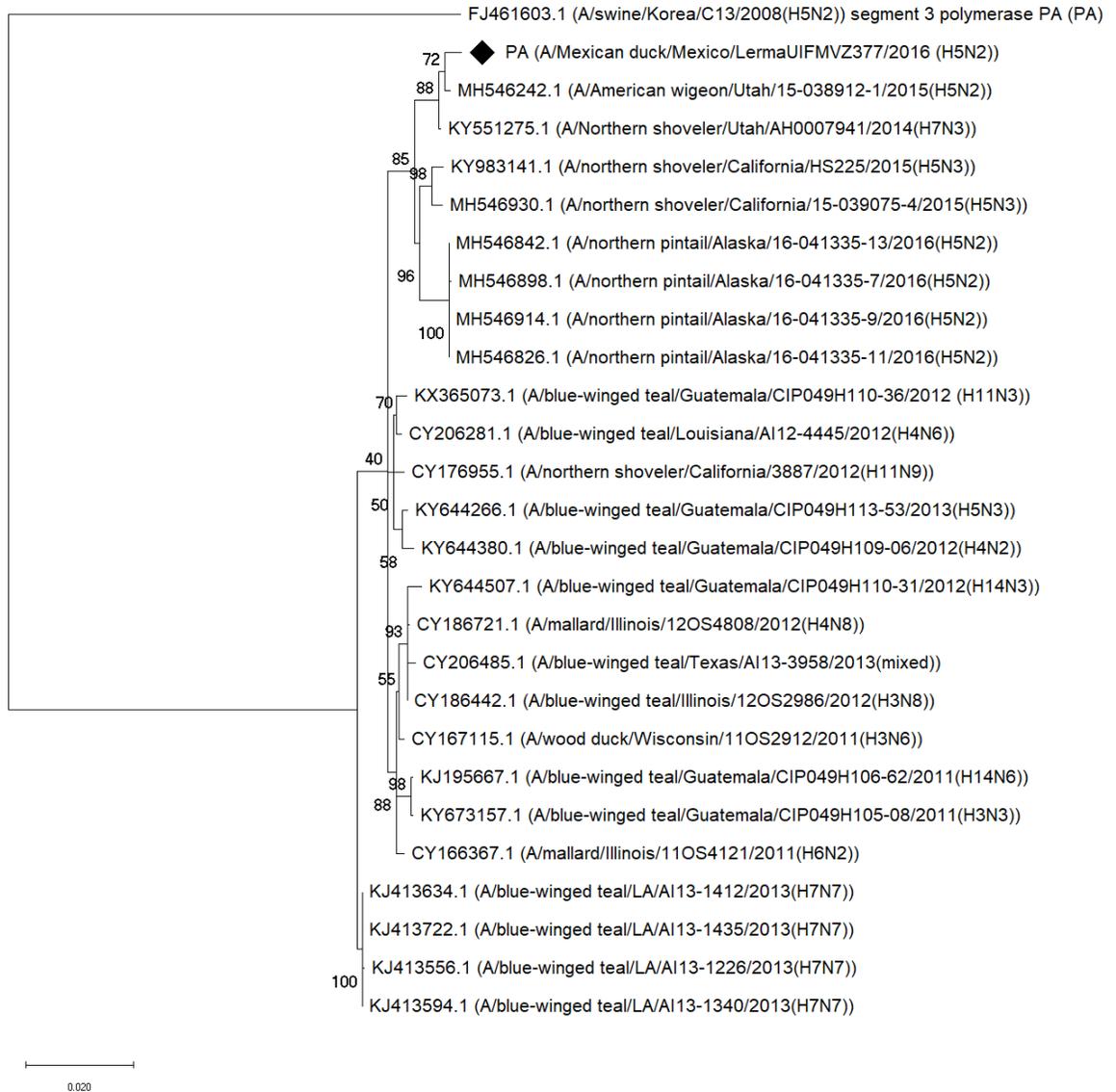


Figura 5 E. Árbol filogenético construido con el algoritmo Máxima verosimilitud del gen PA del VIA aislado a partir de *Anas platyrhynchos diazi*. Análisis filogenético molecular por el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo GTR. Se realizaron búsquedas con el método heurístico *Subtree Pruning & Regrafting* (SPR) y como prueba de la filogenia se utilizó el método de Booststrap, con 1000 réplicas. El porcentaje de los árboles en los cuales los genes asociados se agrupan se muestra al lado de los brazos. El análisis involucró 25 secuencias de nucleótidos. La secuencia identificada en este estudio está indicada con el rombo negro. Como grupo externo se incorporó la secuencia de nucleótidos “Influenza A virus (A/swine/Korea/C13/2008(H5N2)) segment 4 hemagglutinin (HA) gene, complete cds”, número de acceso FJ461593.1.

F



Figura 5 F. Árbol filogenético construido con el algoritmo Máxima verosimilitud del gen NP del VIA aislado a partir de *Anas platyrhynchos diazi*. Análisis filogenético molecular por el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo GTR. Se realizaron búsquedas con el método heurístico *Subtree Pruning & Regrafting* (SPR) y como prueba de la filogenia se utilizó el método de Bootstrap, con 1000 réplicas. El porcentaje de los árboles en los cuales los genes asociados se agrupan se muestra al lado de los brazos. El análisis involucró 25 secuencias de nucleótidos. La secuencia identificada en este estudio está indicada con el rombo negro.

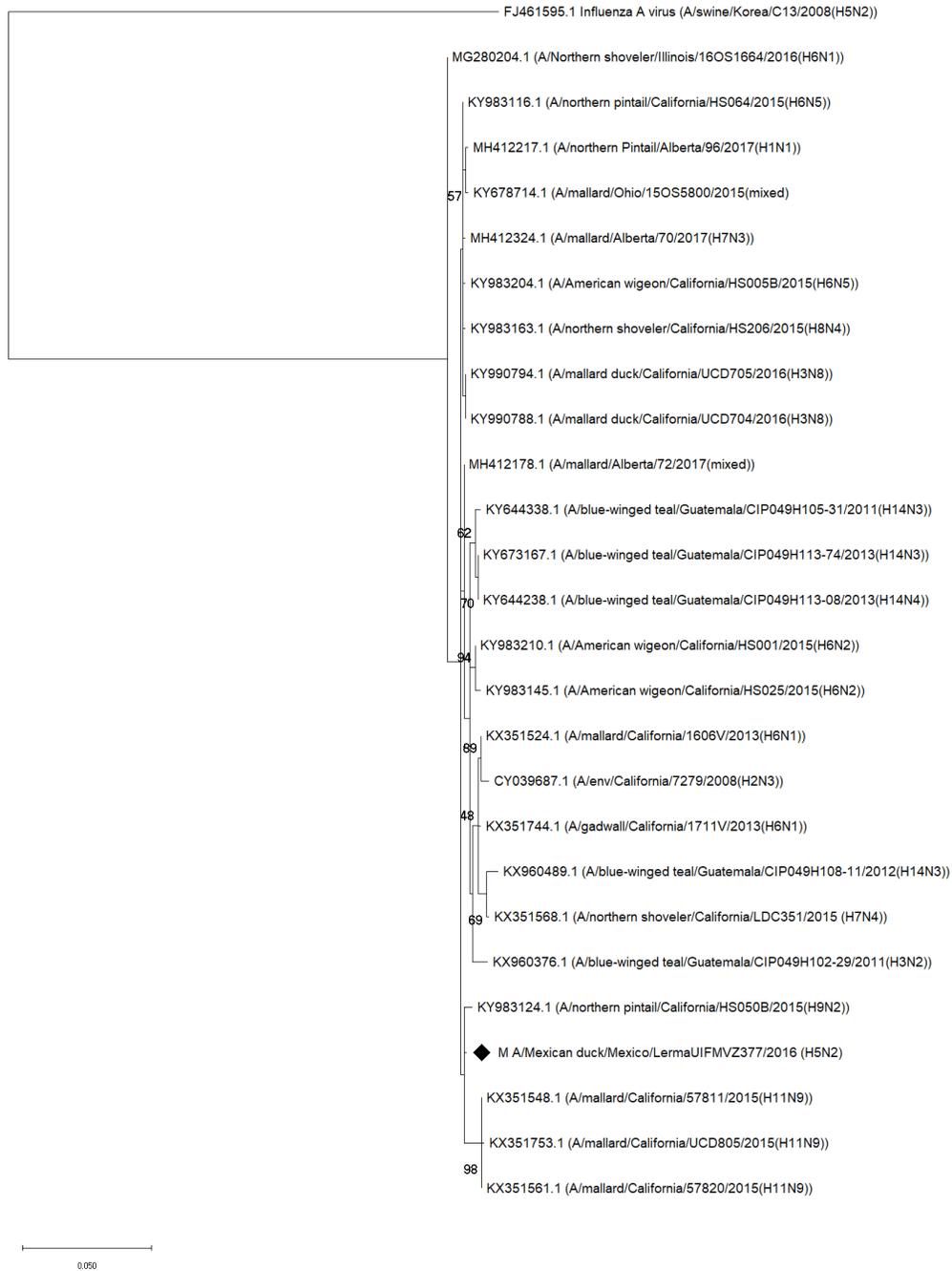
G

Figura 5 G. Árbol filogenético construido con el algoritmo Máxima verosimilitud del gen M del VIA aislado a partir de *Anas platyrhynchos diazi*. Análisis filogenético molecular por el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo GTR. Se realizaron búsquedas con el método heurístico *Subtree Pruning & Regrafting* (SPR) y como prueba de la filogenia se utilizó el método de Booststrap, con 1000 réplicas. El porcentaje de los árboles en los cuales los genes asociados se agrupan se muestra al lado de los brazos. El análisis involucró 25 secuencias de nucleótidos. La secuencia identificada en este estudio está indicada con el rombo negro.

H

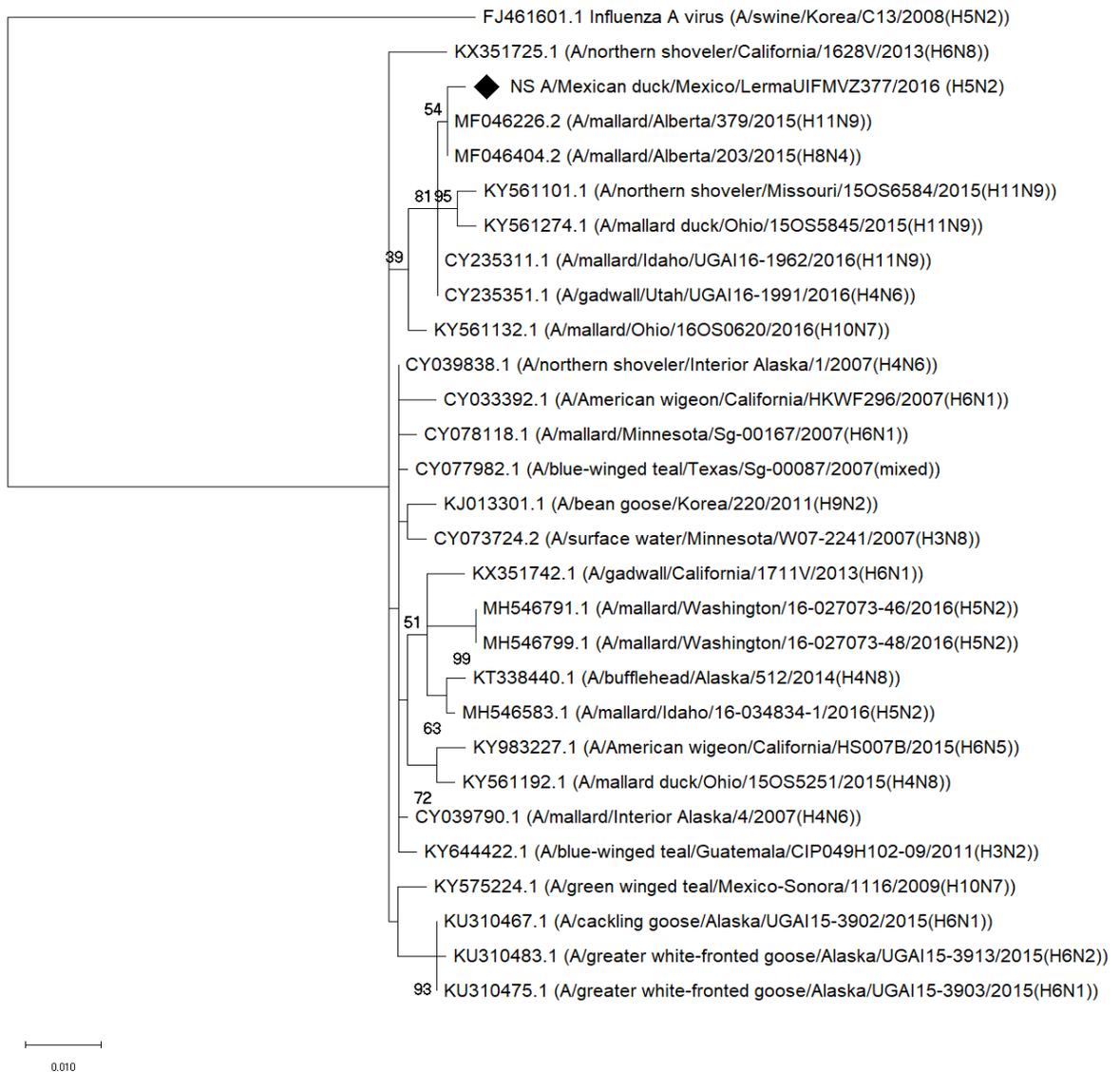


Figura 5 H. Árbol filogenético construido con el algoritmo Máxima verosimilitud del gen NS del VIA aislado a partir de *Anas platyrhynchos diazi*. Análisis filogenético molecular por el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo GTR. Se realizaron búsquedas con el método heurístico *Subtree Pruning & Regrafting* (SPR) y como prueba de la filogenia se utilizó el método de Booststrap, con 1000 réplicas. El porcentaje de los árboles en los cuales los genes asociados se agrupan se muestra al lado de los brazos. El análisis involucró 25 secuencias de nucleótidos. La secuencia identificada en este estudio está indicada con el rombo negro. Como grupo externo se incorporó la secuencia de nucleótidos “Influenza A virus (A/swine/Korea/C13/2008(H5N2)) segment 4 hemagglutinin (HA) gene, complete cds”, número de acceso FJ461593.1.

Cuadro 5. Homología, identidad de nucleótidos y distancia genética por segmento del genoma de VIA aislado a partir del pato mexicano

Gen	Virus con mayor homología	% identidad de nucleótidos	Distancia genética	Acceso GenBank
PB2	A/northern_pintail/California/HS064/2015(H6N5)	99.48	0.00405405	KY983177.1
PB1	A/American_wigeon/Utah/AH0067123/2015(H7N7)	99.09	0.00679656	KY551353.1
PA	A/American_wigeon/Utah/15-038912-1/2015(H5N2)	99.30	0.00426894	MH546242.1
HA	A/gadwall/Arkansas/15OS7729/2015(H5N2)	99.00	0.01235330	KY284403.1
NP	A/blue-winged_teal/Missouri/15OS4861/2015(H4N6)	99.66	0.00284495	KY284474.1
NA	A/mallard/Alaska/16-029597-2/2016(H5N2)	98.74	0.00867052	MH546142.1
M	A/northern_pintail/California/HS050B/2015(H9N2)	99.40	0.00415800	KY983124.1
NS	A/mallard/Alberta/379/2015(H11N9)	99.76	0.00248447	MF046226.2

Secuencias obtenidas a partir de patos migratorios relacionadas con subtipos detectados en animales domésticos

Subtipo H5N2 relacionados a subtipos porcinos y aviares de las muestras 80 (*Anas crecca*), 507 (*Spatula discors*) y 613 (*Spatula clypeata*)

Las tres muestras presentaron similitud en el análisis BLAST con el subtipo H5N2 y con el H3N2 de origen porcino y aviar, mostrando mayor identidad con virus H5N2 (A/swine/Mexico/GtoDMZC02/2014(H5N2)) (Gto.) aislado a partir de muestras de cerdos domésticos en el estado de Guanajuato, México en 2014 (Saavedra-Montañez *et al.*, 2018). Al realizar el alineamiento entre las tres muestras y el virus (Gto.) con el programa MEGA X, se observó una similitud del 100% en todos los genes, a excepción del gen M de las muestras 80 y 507, que presentan un gap de arginina (R) en la posición 18 (Anexo 3, Figura 9). El gen NS de la muestra 613 también difirió, ya que mostró mayor similitud con el subtipo H3N2, con un 99% de identidad con el virus (A/swine/Mexico/Mex50/2010(H3N2)). Por otro lado, el gen PA de las tres muestras presenta al análisis BLAST un 100% de identidad con un virus aviar aislado en 1995: (A/chicken/Hidalgo/28159-232/1995(H5N2)) (Chicken) (Cuadro 6).

Subtipo H3N2 relacionados a subtipos porcinos de las muestras 456, 465, 169 (*Anas crecca*) y 478 (*Spatula discors*)

Estas muestras se relacionaron con dos virus del subtipo H3N2 aisladas a partir de cerdos en México en 2010. Las secuencias de nucleótidos de los genes HA, PB1, PB2 de estas muestras tienen similitud del 99% con respecto al virus (A/swine/Mexico/Mex51/2010(H3N2)) (Mex 51) (sin publicación), aislado en el Estado de México. En estos genes no se observaron cambios en los aminoácidos con respecto a Mex 51, a excepción del gen HA de las cuatro muestras, ya que en el alineamiento de ácidos nucleicos se observan tres gaps anidados en las posiciones 60-70 (ACA) y datos faltantes en los aminoácidos en las posiciones 23 y 24 (delección de ácido aspártico, D, y asparagina, N) (Anexo 3, Figura 10). Por otra parte, el gen PA presentó similitud de 99% con dos virus: (A/swine/Mexico/Mich40/2010(H3N2)) y (A/swine/Mexico/Mex50/2010(H3N2)). Los genes NS, NP y M presentaron una similitud de 100%, A/swine/Mexico/Mex50/2010(H3N2), mientras que la NA presentó un 99% de identidad con el mismo virus (Cuadro 6).

Subtipo H1N1 relacionados a subtipos porcinos de la muestra 322 (*Spatula discors*)

La secuencia de nucleótidos obtenida de esta muestra presenta identidad con diferentes cepas del subtipo H1N1 identificados en los estados de Querétaro, Estado de México y Veracruz. El gen HA tiene 100% de identidad con el virus A/swine/Mexico/Mex52/2010(H1N1) aislado en el Estado de México en 2010. El gen NA tiene 99% de identidad con el virus (A/swine/Mexico/Qro32/2010(H1N1)), con cuatro gaps indicados en el análisis BLAST. El gen PB1 presenta similitud del 99% con (A/swine/Mexico/Ver29/2010(H1N1)). El gen PB2 se relaciona con (A/swine/Mexico/Ver37/2010(H1N1)). La polimerasa ácida presenta también un 99% de similitud con (A/swine/Mexico/Mex52/2010(H1N1)). El gen NS con (A/swine/Mexico/Qro35/2010(H1N1)). Por otra parte, los genes NP y M tienen 100% de identidad con el virus (A/swine/Mexico/Mex19/2010(H1N1)).

En el Cuadro 6 se resumen los virus aislados en la presente investigación, y de los cuales se encontró similitud con subtipos aislados a partir de porcinos y uno a partir de pollos de engorda. Algunos segmentos presentaron el 100% de identidad con ciertas cepas.

Cuadro 6. Identidad de cada segmento de los ocho VIA porcinos y aviares aislados en patos migratorios

		PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS
<i>Anas crecca</i> , <i>Spatula discors</i> , <i>Spatula clypeata</i>	H5N2	Gto 100%	Gto 100%	Chicken 100%	Gto 100%	Gto 100%	Gto 100%	Gto 100%	Gto 100% Mex50* (H3N2) 99%
<i>Anas crecca</i> (3), <i>Spatula discors</i>	H3N2	Mex 51 99%	Mex 51 100%	Mich 40 99%	Mex 51 99%	Mex 50 100%	Mex 51 99%	Mex 50 100%	Mex 50 100%
<i>Spatula discors</i>	H1N1	Ver 37 99%	Ver 29 99%	Mex 52 99%	Mex 52 100%	Mex 19 99%	Qro 32 99%	Mex 19 99%	Qro 35 99%

Los cuadros azules tienen mayor identidad con virus de orígenes aviares. Los cuadros verdes tienen mayor identidad con subtipos de orígenes porcinos. El gen NS difiere en la muestra de *Spatula clypeata*. Las abreviaturas corresponden a la cepa con mayor identidad (e.g. "Gto": A/swine/Mexico/GtoDMZC02/2014(H5N2); A/swine/Mexico/Mex51/2010(H3N2), A/swine/Mexico/Mex50/2010(H3N2) y A/swine/Mexico/Mich40/2010(H3N2); A/swine/Mexico/Mex52/2010(H1N1), virus (A/swine/Mexico/Qro32/2010(H1N1), (A/swine/Mexico/Ver29/2010(H1N1), (A/swine/Mexico/Ver37/2010(H1N1), (A/swine/Mexico/Mex19/2010(H1N1)).

DISCUSIÓN

El propósito del presente trabajo fue detectar la circulación de virus de influenza A en aves silvestres y de traspatio en una zona de interfaz en las Ciénegas de Lerma, así como identificar la diversidad filogenética de estos virus, y los factores que podrían intervenir en la transmisión entre las especies. Entre los hallazgos principales destacan que de las 597 muestras colectadas en patos silvestres durante la temporada invernal 2016 – 2017, se identificaron 22 positivas a VIA mediante qRT-PCR en 4 de 10 especies de patos silvestres, lo que corresponde a 3.6% de frecuencia de VIA. De estas 22 muestras, se lograron aislar nueve VIA a partir de hisopos cloacales colectados en 3 especies de patos migratorias y una residente. Aunado a esto, con las secuencias de ácidos nucleicos obtenidas se identificaron los subtipos H5N2, H3N2 y H1N1. El subtipo H5N2 aislado a partir de la muestra del pato residente, *Anas platyrhynchos diazi*, se identificó como un virus con genes tanto de diferentes orígenes geográficos como de diferentes especies de pato silvestre provenientes de Estados Unidos y Canadá. Los subtipos H5N2, H3N2 y H1N1 aislados de los patos migratorios *Anas crecca*, *Spatula discors* y *Spatula clypeata* se relacionaron con subtipos de origen porcino y aviar que circulan en granjas en México. Con respecto a las muestras obtenidas a partir de aves domésticas, éstas resultaron negativas a VIA mediante qRT-PCR.

Con relación a la temporalidad, en este estudio se identificaron más muestras positivas al inicio de la llegada de aves acuáticas a la Ciénega. Estos resultados concuerdan con estudios previos que indican que la prevalencia de los VIA en aves migratorias disminuye en gradiente de norte a sur, y va desde el 30% hasta menos del 1% dependiendo de la estación del año y del área geográfica, por ejemplo, del 0.4 al 2% en áreas de descanso invernales en el sur de Estados Unidos, y del 0.25% en patos que regresan a zonas de reproducción en primavera (Krauss *et al.*, 2004; Munster *et al.*, 2007). Por otro lado, Ip *et al.* (2008) encontraron una tasa de prevalencia del 2.5% en aves migratorias que regresaron a Alaska, y sugieren que la transmisión ave-ave en aves acuáticas podría ser suficiente para perpetuar los VIA de un año a otro (Ip *et al.*, 2008). En contraste, Olsen (2008) menciona la posibilidad de que los VIBP podrían persistir en los patos de un año a otro debido a que estos agentes pueden perpetuarse en agua congelada, lo que no se presenta

a lo largo del año en el sitio de muestreo del presente estudio (Olsen *et al.*, 2006b). Sin embargo, el rearreglo de los VIA es frecuente en infecciones concomitantes (Hatchette, 2004), lo que no se descarta en el VIA identificado en el pato mexicano, el cual, por la fecha de colecta de la muestra, el 11 de diciembre, debió haberse contaminado a inicios de ese mismo mes, después de aproximadamente 30 a 40 días después de haber iniciado el arribo de las aves migratorias.

El hallazgo de VIA en patos silvestres del presente trabajo concuerda con los estudios que se han realizado en México mencionados a continuación. Entre 2007 a 2009, en el norte de México, Sonora, se detectó el virus en ocho especies de patos silvestres y se identificaron tres subtipos, H5, H6 y H9. El subtipo H5 se identificó en los patos migratorios *S. clypeata* y *Aythya americana*, H6 en *A. crecca* y H9 en *M. americana* (Montalvo-Corral y Hernández, 2010). Los autores indicaron similitud con aislados provenientes de aves silvestres de California, Estados Unidos, aunado a que probablemente esos subtipos infectaron diferentes especies de aves en algunos puntos de la ruta migratoria del Pacífico y se fueron diversificando genéticamente a través de varias poblaciones de aves. La frecuencia de detección del virus fue similar a la del presente estudio: 3.6% general, y 2.93% y 4.3% por año (Montalvo-Corral, López-Robles y Hernández, 2011). También se han realizado algunos estudios en el mismo sitio de muestreo. En el invierno de 2005 se identificó en *S. cyanoptera* un VIABP del subtipo H7N3 que mostró 100% de identidad con un virus aislado en Nueva York, y el subtipo H4N2 en el agua (Cuevas-Domínguez y González-Guzmán, 2009; Ornelas-Eusebio *et al.*, 2015) Adicionalmente, en un cuerpo de agua cercano a las Ciénegas de Lerma, en 2007 - 2008 se identificó en patos centinelas el subtipo H6N2 (Barrón-Rodríguez *et al.*, 2018). Estos últimos hallazgos tienen relación con los genes aislados en el pato mexicano del presente estudio.

Se identificaron los genes HA, NA y PA, con mayor homología a virus H5N2 aislados en Arkansas, Alaska y Utah, respectivamente, en EEUU, regiones correspondientes a dos rutas migratorias, Mississippi (Arkansas) y Pacífico (Alaska y Utah). Aunado a esto, el gen PB2 tienen las distancias genéticas más cortas con respecto al subtipo H6N5. Se identificó que el gen PB1 se relaciona filogenéticamente con el subtipo H7 aislado en la ruta migratoria del Pacífico. El gen NP tiene una alta similitud con el subtipo H4 identificado en Missouri, localizado en la ruta migratoria del Mississippi. Con relación a los genes M y NS,

estos tienen mayor homología con subtipos H9 y H11 identificados en California y Alberta, respectivamente. Con respecto a estudios anteriores en México, hay coincidencia en el hallazgo de VIA en las especies *S. cyanoptera*, *S. clypeata*, *A. crecca*, *S. discors* y *A. platyrhynchos diazi*.

El hallazgo del virus H5N2 aislado en el pato mexicano relacionado con subtipos norteamericanos confirma de manera parcial la sugerencia de Spackman *et al.*, (2005) de que múltiples virus se mantienen al mismo tiempo en el ambiente y en sus hospederos reservorios (Spackman *et al.*, 2005). Aunado a esto, Montalvo *et al.*, (2011) indicaron que la circulación de estos virus en las poblaciones de aves migratorias en México podría mantenerse debido a la exposición continua a los viriones así como a los patrones de comportamiento de éstas (Montalvo-Corral, López-Robles y Hernández, 2011). Barrón *et al.* sugieren el rearreglo previo entre diferentes subtipos del virus identificado en patos centinelas, el cual ingresó por la ruta del Pacífico (Barrón-Rodríguez *et al.*, 2018), lo cual podría corresponder con el virus aislado en esta investigación. En este sentido, el subtipo H7N3 AP que ha afectado a aves domésticas en México desde 2012, se originó por el rearreglo de diferentes VIABP, y se ha indicado a México como región potencial para el reordenamiento viral, debido al contacto entre aves silvestres provenientes de diferentes rutas migratorias (Lu, Lycett y Leigh Brown, 2014).

La importancia de la identificación de este virus en un pato residente radica en que además de nuevas variantes antigénicas, se podrían generar nuevos subtipos más virulentos si se presentara un salto interespecie tanto para las aves silvestres acuáticas (ya que ciertas especies utilizan la misma fuente de agua durante la migración), aves no acuáticas que cohabitan en el cuerpo de agua natural, así como para las especies domésticas con las que se tiene contacto directo o indirecto (Fuller *et al.*, 2013; Verhagen *et al.*, 2015). Sin embargo, el subtipo H5N2 ha estado circulando en aves domésticas desde 2003, pero se podrían generar nuevos subtipos de BP que se adapten a especies domésticas y se comporten como VIAAP (Horimoto *et al.*, 1995).

En el presente trabajo no se pudo demostrar la transmisión entre especies silvestres y domésticas, dado que todas las muestras obtenidas a partir de aves domésticas resultaron negativas a VIA mediante diagnóstico molecular. Esto a pesar de que se identificaron aves

migratorias positivas a VIA, y así como manejo y características de las granjas que se han reconocido en la literatura como relevantes para la transmisión interespecie.

Los ocho subtipos aislados en la presente investigación, y que tienen similitudes mayores al 99% con virus porcinos de estudios previos, se relacionan filogenéticamente con VIA que fueron identificados en 2010 y 2014, tanto en el Estado de México, como en otros estados cercanos: Guanajuato, Hidalgo, Michoacán y Querétaro. En este sentido, los hallazgos de VIA porcinos aislados en patos silvestres son escasos. En un estudio, Olsen *et al* (2003) reportaron el aislamiento de VIA en patos silvestres relacionados a subtipos porcinos en Carolina del Norte, Estados Unidos: se identificó el subtipo H1N2 (A/Duck/North Carolina/91347/01 (H1N2)) aislado en patos silvestres cazados en el año 2000 (probablemente *A. platyrhynchos* o *Aix sponsa*), el cual se relacionó filogenéticamente con VIA H1N2 rearrreglado porcino, aviar y humano, y con virus H3N2 aislados de cerdos en E.U.A. desde 1998, con identidades mayores al 98% (98.1% a 99.2%), lo que concuerda con los subtipos identificados en la presente investigación, los cuales tienen 99% de identidad con subtipos porcinos. En ese estudio los autores refieren que probablemente el subtipo H1N2 hubiese sido introducido en primera instancia por patos, los cuales infectaron posteriormente a los cerdos (Olsen, Karasin y Erickson, 2003).

Tres de los ocho VIA que fueron aislados y que tienen similitud con el subtipo H5N2 porcino, presentaron un 99% de identidad con el virus (Gto.) (Cuadro 6), el cual fue identificado en porcinos infectados a partir de virus aviares (Chicken). Los autores refieren que en la zona centro de México ocurren gran cantidad de rearreglos debido a la interacción de diferentes especies en el mismo hábitat, además de que la transmisión interespecie del virus aviar a los cerdos fue intacta (Saavedra-Montañez *et al.*, 2018). Esto podría indicar que los VIA subtipo H5N2 del presente estudio, que tienen ancestros de origen de pollo, pudieron haber infectado a los patos silvestres de forma indirecta, además de que los anátidos silvestres son reservorios naturales de los VIA, como lo indicó el estudio de Olsen *et al.*, (2003) en donde los patos silvestres se infectaron con un subtipo H1N2 (Olsen, Karasin y Erickson, 2003).

Por otro lado, cuatro muestras tomadas de patos silvestres migratorios tuvieron 99 y 100% de similitud con virus H3N2 que han sido reportados en el Estado de México y en Michoacán a partir de muestras de cerdos en 2010 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Adicionalmente, el

genoma de la muestra tomada a partir de *Spatula discors* se relacionó con siete virus subtipo H1N1 aislados también en 2010 en diferentes estados de México, con un 100% de identidad con el gen HA y 99% de identidad con el resto de los segmentos. Estos resultados podrían indicar que los patos silvestres fueron infectados a partir de las granjas cercanas y/o del ambiente, sin embargo, el mecanismo de transmisión se desconoce.

Dado que no hay mucha información acerca de la transmisión de VIA de subtipos porcinos a patos silvestres, es necesario que estudios futuros se dirijan a la identificación de la fuente de contaminación de VIA de las granjas de traspatio hacia el ecosistema de las Ciénegas de Lerma. Si bien se han realizado estudios donde se identifica la perpetuación de VIA de patos silvestres en el agua, dichos estudios *in situ* se han realizado en latitudes cercanas al polo norte durante la épocas invernales donde el agua se congela, condiciones que no se presentan en el área geográfica del presente estudio, por lo que es necesario investigar de qué manera se infectaron los patos silvestres con estos subtipos (Domanska-Blicharz *et al.*, 2010; de Silva *et al.*, 2012; Cappelle *et al.*, 2014). En el caso de México, se ha identificado el VIA H4N2 que se aisló a partir de muestras de agua en las Ciénegas de Lerma, Estado de México en época invernal (Ornelas-Eusebio *et al.*, 2015), sin embargo, este subtipo no se identificó en las muestras de los patos silvestres de esta investigación. En este sentido, son necesarios más estudios que: 1) incorporen el análisis del agua, tanto de aguas residuales y de bebida de las granjas, así como el agua del humedal (lugares donde habitan los reservorios naturales de los virus de influenza A; 2) investiguen posibles fuentes ambientales de contaminación, como tierra, superficies de objetos como botas, instalaciones, herramientas, vehículos; 3) amplíen la zona de muestreo de animales productivos bajo esquemas de traspatio; 4) incluya el muestreo de granjas localizadas en zonas susceptibles de inundación.

El pato mexicano es considerado una subespecie del pato de collar, *Anas platyrhynchos*. Este último es el anátido con el mayor número de reportes de VIA en todo el mundo (Olsen *et al.*, 2006a; Chen and Holmes, 2009; Wilcox *et al.*, 2011; Verhagen *et al.*, 2017b), por lo que se considera de gran importancia monitorear los VIA a lo largo del año en poblaciones del pato mexicano, sobre todo porque es una especie residente considerada bajo el estado de conservación de amenazada. Además, se desconoce el papel que desempeñan las aves residentes en el mantenimiento de los VIA. Debido a esto, se sugiere para posteriores estudios ampliar la escala espaciotemporal del análisis, alrededor de la temporada

migratoria. Adicionalmente, se sugiere el estudio de VIA en otros animales silvestres, como en las especies del orden Charadriiformes que cohabitan en el humedal, aves no acuáticas y mamíferos silvestres que viven en la región, ya que se ha identificado a diversas especies como portadoras del virus.

Se recomienda continuar con el análisis de las secuencias de los genes de los virus aislados, tales como análisis *in silico* de las proteínas virales para la identificación de mutaciones asociadas con la patogenicidad. Por otro lado, con la aplicación de encuestas a los productores de la región, es posible la construcción de modelos analíticos espaciales que ayuden a estudiar la dinámica de transmisión de los virus de influenza entre las diversas especies que cohabitan en el área natural protegida y sus alrededores.

CONCLUSIONES

- No se identificó la transmisión interespecie de VIA de patos silvestres a aves domésticas de traspatio, por lo que la hipótesis de la presente investigación es rechazada.
- Se identificó la circulación de VIA en 22 muestras de patos silvestres, uno residente y tres migratorios.
- Se aislaron los subtipos H5N2, H3N2 y H1N1 a partir de nueve muestras de patos silvestres.
- Un virus del subtipo H5N2, obtenido a partir *Anas platyrhynchos diazi*, se relacionó con VIA de aves migratorias Norteamérica.
- Ocho virus aislados presentaron identidad del 99% al 100% en sus genes, así como homología con virus porcinos.

ABREVIATURAS

AICAS	Área de Importancia para la Conservación de Aves Silvestres
ANP	Área Natural Protegida
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Chicken	(A/chicken/Hidalgo/28159-232/1995(H5N2))
Gto.	(A/swine/Mexico/GtoDMZC02/2014(H5N2))
GTR+I	Gamma Distribution Parameter
HA	Hemaglutinina
M1	Proteína de matriz estructural
M2	Proteína del canal iónico
MEGA	Programa Molecular Evolutionary Genetic Analysis
Mex 51	(A/swine/Mexico/Mex51/2010(H3N2))
NA	Neuraminidasa
NEP	Proteína de exporte nuclear
NP	Nucleoproteína
NS1	Proteína no estructural
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal
PA	Polimerasa ácida
PB	Baja patogenicidad
PB1	Polimerasa básica 1
PB2	Polimerasa básica 2
qRT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcripción Reversa en Tiempo Real
RNPs	Ribonucleoproteínas
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa de Transcripción Reversa
SENASICA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SPR	Subtree Pruning & Regrafting
UMA	Unidad de Manejo para la Conservación de Vida Silvestre
VIA	Virus de Influenza A
VIAAP	Virus de Influenza A de alta patogenicidad
VIABP	Virus de Influenza A de baja patogenicidad

ANEXOS

Anexo 1. Secuencias de ácidos nucleicos del VIA H5N2 aislado a partir de *Anas platyrhynchos diazi*

Gen PB2

>PB2_377

```
GACCTGATGCGGAGTAGAAACAAGGTCGTTTTAAACAATTCGACACTAATTGATGGCCA
TCCGAATTCCTTTGGTCGCTGTCTGGCTGTCAGTAAGTATGCTAGAGTCCCGTTCCGTT
TCATCACCAACACCACGTCTCCTTGCCCAATTAGCACATTAGCCTTCTCTCCCTTTGCAA
GATTGCTCAGCTCATTGATGCTCAATGCTGGGCCATATCTCTTGCTTTTGGCCAAA
TGAGGAATCCTCTTAAAAACAGCAGACTCCACTCCAGCTGTGCCTTCATCTGGGTCTTCGG
TCAATGCACCCGCATCTTCCCGAGAAGTGTGAGCCTCTTGGTGGCCTTGTTGTAATTGA
ACACTGGGGAATTGCCTCTTACCAGTATTCTCATTCTGATCCTCTCACATTACAGTTA
GGGAGGAAAAGTGCATCCTACTTTGTTCCGGTGGGGCAGCAGCAAAGGGGAGGAGTTTTA
TTATCTGAACAGTGTCAAATGTTCCAAGCACATCTCGCATTTGCTGGAATAGTGTCTCA
CGAACCCACTGTATTGACCTCTTGCTGCCTTAGGGACCAGAGACTGAAATGGCTCGAATT
CCATCTTATTATACAACATTGTGGGATCCTGTGACCATTGAATTTTTACAGTTTCCAGT
TTCTGATTACCCACTGATAGGTATTGACCAACACCGACTCAGGGCCATTGATCTCCACA
TCATTGATGACGAATAAGTGATTGTCAGTTTCTCCGTTCTTGTGTCTCGCTGACTTCTT
CGGGTGACAATAGTACGTTCCCGCTGGTCTCGAAGTCTTAAAAATCGGTGATGCTTA
CTACTACCCGCTCTGACTGGAGTATTCATCTACTCCCATTTACTGACTCTTATTTCCC
TCAGTGACATCTCAGTACTTGGGGTCATGTCAGGCAATATCCCGATCATTCCCATCACAT
TGTCAATGGGTTCAATCCCAATTTGGAAAAGCACTTTTGCATCCTTTTGGAAAGTGTCT
TCAAGAGCTGATGCATTGGGTTTCAGCCGCTGGTTCGCCCTATTGACAAAATTCAGGTGAC
CTCGAACTGCCTTAATCATGCAGTCCCTCTTGTGAGAATACCATGGCCACAATTATTGCTT
CAGCAATTGACTGCTCGTCTCTTCCGCTTACTATTAGCTGGATCAGCCTTCTGGTTGCCT
TCCTGAGAATAGCAGTTGCTCTCCTTCCAACATTGTGAAGTCTTATACCCCTCATGTA
CTCTTATTTTCAATGTTTGAAGTTGCCGTAAGCACTTCTTCTCCCTTTTACTGACG
ATCCACTTGTTCTTTTAAAAGTGAATCCACCAAAGCTGAAAGATGAGCTAATCCTCAAGC
CCATTGCTGCCTTGCATATGTCCACGGCTTGTTCCTCTGTTGGATTTTCCGAAGAATGT
CTACCATCTTATTTCCCAATTTCTGTGCTGTGGCACATCTCCAATAGAGATGCTAATGG
GTCTGCTGACACTGTTGCTCTCCTTACTATGTTCCCTGGCAGCAATAATCAAGCTCTGGTC
TACATCATCGTTTCTCACTTCTCCTCCCGGAGTATACATCTGCTCCCAGCATGTCCCCTG
GGTCAAATGCAGCACCTCAATGTAGACTGCTTGTTCACCAGCCACTGGGAGAAACCT
TGCTTTGCGTACCAACTCTTTCTAGCATGTATGCAACCATTAGAGGGGCGATTTTACA
GTCCTGGAGTTCTTCTTCTTCTCCTTTGTTATCGTCAGTTGTGACTCCGACGTTAGTAT
TCTCGCTCCAACCTTCATTTGGAAAGACAACCTCCATGATTACATCCTGTGCCTCTTTGGC
ACTGAGGTCAGCATGGCCCGGTTTATGTCGACCCTCCGTCTTATCTTAACTTGGTTTTCT
GAAATGTACAGGGCCAAAGGTCCCGTGTTC AACCTTTCAACTTTTTCGAAATAAGTTTT
ATATACCTTGGGATAGTGAAGTGTACTTGTGTTGGTCCATTCTTCCACCATGTCAC
AGCCAGGGGTGATACCATCACTCGGTCTGATCCGGCATCGTTTGTGTTGCTCCAGAGGGT
TTGCCCTTGTTCATTCTTTTCCAGGGATCATTTCATTATTGCTTGTCTGCTGTGATTGG
ATATTTTCAATGCCATCATCCATTTATCCTGAGTGCAGGGTCTTCTCTTGCCTTCCCGA
TGTGTACTTTTTGATTATGGCCATGTGGTCAACAGTGGTTTTGGTTAGTATCTCGCGAGT
GCGAGACTGTGACATTAGATCTCTTAGTTCTTTTATTCTCTCCATATTGAATATATTTGA
CCTGCTTTTCGCTGGCGTATCCAG
```

Gen PB1

>PB1_377

```
CTGGATACGCCAGCGAAAGCAGGCAAACCATTTGAATGGATGTCAATCCGACTTTACTTT
TCTTGAAAGTTCCAGCGCAAAATGCCATAAGCATCACATTCCTCGTATACTGGAGATCCTC
CATACAGCCATGGAACAGGAACAGGATATACCATGGACACAGTTAACAGAACACATCAGT
ATTCAGAAAAAGGGAAATGGACAACAACTCAGAACTGGAGCACCTCAACTCAATCCAA
TTGATGGGCCATTGCCTGAGGACAATGAACCAAGTGGATATGCACAAACGGACTGTGTCC
TTGAAGCAATGGCTTTTTCTTGAAGAGTCCCACCCAGGAATCTTTGAAAACCTCGTGTCTTG
AAACGATGGAAGTTGTTCAACAAACAAGAGTGGACAAATTGACCCAAGGCCGTGACACCT
ATGATTGGACATTAACAGGAATCAGCCGGCTGCAACTGCATTAGCTAATACTATAGAGG
TCTTCAGATCGAACGGTCTTACAGCTAATGAGTCAGGAAGGCTAATAGATTTTCTCAAGG
ATGTGATGGAATCAATGGATAAAGAGGAAATGGAAATAACAACGCATTTCCAAAGGAAAA
GAAGAGTGAGAGACAACATGACCAAGAAAATGGTCACACAAAGGACAATAGGAAAGAAGA
AACAGAGACTAAATAAAAGGAGCTATCTAATAAGAGCATTAACTGAAACCAATGACAA
AAGACGCCGAAAGAGGCAAATTAAGAGAAAGGGCAATTGCAACACCCGGAATGCAAATCA
GAGGGTTCGTGTACTTTGTTGAAACATTAGCAAGGAGCATCTGTGAGAAGCTTGAACAAT
CTGGACTCCCAGTTGGAGGCAATGAAAAGAAGGCTAACTGGCAAATGTTGTGAGAAAAA
TGATGACTAATTCGCAAGACACAGAGCTTTCTTTCACAATCACTGGAGACAACACCAAAT
GGAATGAGAATCAGAACCCTAGGATGTTTCTGGCAATGATAACATACATAACAGGAACC
AACCTGAATGGTTCAGGAATGTCTTGAGCATTGCACCTATAATGTTCTCAAATAAAATGG
CAAGACTAGGAAAGGATACATGTTCCGAAAGTAAGGCATGAAGCTTCGACACAAATAC
CGGCAGAAATGCTAGCAAGCATTGATCTGAAGTACTTCAATGAGTCAACAAGAAAGAAAA
TAGAGAAGATAAGACCTCTTCTAATAGATGGTACAGCCTCATTAAAGCCCTGGAATGATGA
TGGGCATGTTCAACATGCTGAGTACAGTTTTGGGAGTTTCGATTCTGAATCTAGGGCAA
AGAGGTACACCAAAACAACATACTGGTGGGATGGGCTCCAATCCTCTGATGACTTTGCTC
TCATAGTGAATGCTCCGAATCATGAGGGAATACAAGCAGGAGTAGACAGATTCTATAGAA
CCTGCAAGCTGGTCCGGATCAACATGAGCAAAAAGAAGTCCTACATAAACAGAACAGGAA
CATTTGAATTCACAAGTTTTTTCTACCCTTATGGATTTGTAGCCAACCTTCAGCATGGAGT
TGCCAGTTTTGGAGTGTCTGGTATCAATGAATCTGCAGACATGAGCATTGGAGTAACAG
TGATAAAGAACAACATGATCAACAATGATCTTGGACCAGCAACAGCCCAAATGGCTCTTC
AGCTATTCATCAAGGATTACAGATACACATACCGATGTCACAGAGGGGACACACAAATTC
AGACAAGGAGGTCATTCGAGCTGAAGAAGTTGTGGGAGCAGACCCGCTCAAAGCAGGAC
TGCTGGTCTCAGATGGAGGACCAAATCTATACAATATCCGGAATCTTCACATTCCGGAAG
TCTGCTTGAAATGGGAGCTAATGGATGAAGACTATCAGGGAAGGCTTTGTAACCCCTGA
ACCCATTTGTCAGCCACAAAGAAATAGAGTCTGTGAACAATGCTGTGGTGATGCCAGCTC
ATGGTCCAGCCAAGAGCATGGAATATGATGCTGTTGCTACCACTCACTCCTGGATCCCTA
AGAGGAACCGCTCCATTCTCAATACGAGCCAAAGGGGAATCCTTGAAGACGAACAGATGT
ATCAAAGTGCTGCAATCTATTGAAAAATTTCTCCCTAGCAGTTCATACAGGAGGCCGG
TTGGAATTTCCAGCATGGTGGAGGCCATGGTTTCTAGGGCCCGAATTGATGCGCGAATTG
ACTTCGAATCTGGACGGATTAAGAAGGAGGAGTTTGGCTGAGATCATGAAGATCTGTTCCA
CCATTGAAGAGCTCAGACGGCAGAAAATAGTGAATTTAGCTTGTCTTCATGAAAAATGC
CTTGTCTACTCCGCATCAGGTC
```

Gen PA

>PA_377

```
GACCTGATGCGGAGTAGAAACAAGGTACTTTTTGGACAGTATGGATAGCAAATAGTAGC
ATTGCCACAACCTATTTTCAGTGCATGTGTGAGGAAGGAGTTGAACCAAGATGCATTAAGCA
AAACCCAGGGATCATTAAATCAGGCACTCCTCAATTGCTTCATATAGCCCTCCAAGATCGA
AGGTACCAGGTTCCAGGTTGTCCCTAAGTGCCTGAACAATGAGAAGCAGCTTTCTAGACT
CAGCTGAAAAATCCCTCAAGTTGTGGAGATGCGTACAAACTGTTGAATACAGATTTTGCCA
GCAGAGTTCTGCATACCTTTCCAATGGAGCCTTCTCCACTCCTTTGGGTGACTCCCCAA
TGGGCCATGTCTCTGATTTGTTTTCAAAGAATTCTTTAGTCATGTCTTTTTCTTTGACAG
AAGACTCGGCCTCAATCATGCTTTCAATTTGTTGAAGGGATTGAAGAAGACAGCGCCTCA
TCTCCATACCCCATTTTCATTTTGATTTTGGAAAGTTCCATTGGTCTCACATATAGGAACA
TGGGTCTCGACACTTGGCCAATTGCAGTTCGAAGGAGCATGTCCCCAATTTCAAGGACAC
AGTATTTCTCCCATTTGTGTGGCTCTAGTCTAGGGTCAGTAAGAGAAAACTCCATGCTCA
AAAAATTCACTACATCAGTATCATTCCCTCAAGTGAGACCTTCCCTTTATGATGAACCCAT
ACAGTTTTTTTTCCGCCGCCCTTCTTTGGTTCTGCATTTGCTTATCATTGGAATCAGCT
GGAAATCATCCATTGCTGCGCAAGAAGCGTTGAGCAAGGCTGTGTTTATGTACACTCCTT
TCATTATATATTCTGTTGCCCTGCAGTGGGACACCTCTGCTGTAAAGTAATTTCTCCTCA
TGCTTGCAATGTGTTCAATTGGGGCAACATCCTCCCTATCTCATCGAGTTCTATCCAAC
TTGAGTCAGTCAATTCACAGGCCTTGTGAACTCGCTCTGAATCCAACCTTGCTAGTGATC
TTTGCTCAGGCTCATCGCTATCATACTGTCTCAAGTCGCTTACATCTTTGCAGTCCTCAA
AGTCCACCTTTTCTGGTGCCATGTTTTACCAAGTGCCCATTTCAATTGGCTTGTTTTTCT
TCATGTTTTTCGTTTTCGGAATCTTCTCCTCATTTTCAATATCCTGTAGCTCTGCTAGCA
CTTGCTTCCAAGCCAGGAGATAATTGGGGTTTATGCCCTTTTCATGTGGCTTGACAATAT
TAGGCTCTTCCAGCCGAAAAAGGTCTTCATGCATTTGATTGCATCATACAGCGGTATCC
CCTCGCCCTCATGACTTGGGTCTTCAATGCTGAGCTTCAGAGCATCCATCAGCAGAAATT
TCGATCGCTGGGAGCAAGGAGGGCCTTCTGGTAACCTCAGAGGGCGTGGTGTGTCTTCA
AGAACGGTTCAATTCTAGCATTACTTCTTGGACATTTGAGAAAGCTTGCCCTCAATGC
AGCCGTTTCGGTTCGAATCCATCCACATAGGCTCTAAAGTTTTCAAGGCTGGAGAAGTTTCG
GTGGGAGACTTTGGTCGGCGAGCCTGCGCATGGTTCCCTGTAATTTCAAATCTTTCTTCAA
TTGTCTCTTCGCCTCTCTCGGACTGACGAAAGGAGTCCCAGAGGCCTCTACTGGCCATTT
CTTGCTTATGGTGAATAGTCTAGTTTTGATCCTTGCTCTACTTTCTCATCTAGAGTGT
AGTCTGCTTTAGTAGCCATTTCTTCTCCAGTGAATGAAAAGATGTGGATGTGCGTCTTCT
CAGATTTTTATTTGTTGGCCTTTTCCAAATAGTATATATGGATTTCTCTCCTGGTCACTC
CAATTTCAACAAAACGGTTCTTTGTAATCGTATAAATCCGGGAGAAACTTGGGTTTTT
CAACCCCTGTGGTGTGCAAATGCTGTTTACTACTGTCCAGGCCATAGTACGATCTCTCC
CTTCAATTATCTCAAACCGGTGTTTTAGGAGTGCATTTGGATCGCCAGACTCCACGATTA
TCGACTCACCC
```

Gen HA

>HA_377

GACCTGATGCGGAGTAGAAACAAGGGTGTTTTTAATTATAATCTGAACTCACAGCTCTAG
ATGCAAATTCTGCACTGCAATGATCCATTGGAGCACATCCAAAAAGATAGACCAGCTATC
ATGATTGCCAGTGCTAGGGAACCTGCCACTGTTGAGTAGATTGATAGTATCTGATAGGTG
CCCATTGATTCCAATTTGACTCCGCCTATTTCCCTCCCTGTTCACTCTTGATTCTTCCGAA
TATTGTGGATAGTCATACGTTCCATTTCTCACACTTTCCATGCATTCAATTGTCACACTTG
TGGTAGAATTCAAAGCATCCGTTGCCTAATTCTTTGCATTGTCTCTCAGCTGGAGTCGG
ACCTTATCATATAGATTCTTGACATTTGAATCATGGAAGTCCAAAGTTCTCTCATTTTTCC
ATGAGCACAAAGAAGTTCTGCATTGTAAGTCCATACATCTAAAAACCCATCTTCCATTTTT
CTATTCAAATTTTCTATTCTCCTTTCCAGGTTGTTGAATCTTTCCCAACGGCTTCGAAT
TGAGTGTTCAATTTGTCAATGATTGAGTTTACTTTATTGGTGATCCCATCGATTGCTTTC
TGGGTAGATTCTTTGTCTGCAGCATACCCACTCCCTGCTCATTGCTATGATGGTATCCG
TACCATCCATCAACCATTCTTGCCATCCTCTCTATGAATCCTGATGTTCCAAAT
AGGCCTCTTGTCTCTTTGGGGGACGTTTCTTAGTCTGTTGCAAGGACCAGCTTGTCC
GATTTGACATACTTGGGGCACTCCCAATGGTAAGGGGATGAACATTGTGGAAGGGCATA
CTGGAATTTATAGCTCCCACTGGGGTCTGACATTTGGTGTACAGTTACCATACTCCAAT
TCACTCCTCATGATTGCTGAATTTCCCTTCTTGACAATCTTGTATGCATATTCAGGGGCT
ATAAAATCCCATTGCTTTCAAAGCTGATTGCATCGTTCGGCCTCAGTATTGTCCAGAAA
AATCCATTCTTCCACTTTGCCCGTTCACTTTGGGTCTAGTGGCTATTTCTGGGATTGAT
CTCTGATTCAAGTGTGATGTTCCCTACAGACACATAAGTGTTTCGAGTTCTGATAGAGCTTT
GTTTGTTCAGCTGCATCATTAGGATGGTGAATTTCCCATATTATTAAGGTTCTTCTACA
TTGGTGTTGTTGTAGGTCCTCTTTATTGTTGGGTACGCACTGTTCTTCTGATCAACCAC
ACCACATTCTGAAAAAAGAAGATCTGCCATTGTACGGGCATGCCGAACCTTACTCCTGAT
GAGGCATCATGATTGGACCAAGAAGTCCCTAGGAATTAATCTGAATTTCTCAAATGGTTT
GTGCTGCTCATTAAATGCTTCAGTTCTTCTGTAATCATTGAAGTTCCCTGGATAGCACTGA
CCATTAAGTGGATTATCCTTTTCCACGATGTATGACCATTCCGGTACATTGAGGAATTCA
TCACACATTGGGTTTCCAAGAAGCCATCCAGCTACACTGCAATCCTTCAGAATGAGGGGC
CTCACTCCTTTAATACTGCAAAGTTTTCCATTGTGCTCTTTTTCCAGTATATCCTGAGCA
TGTGTGACCGTCACATTCTTCTCCATGATTGTATCAACCTGCTCTGTTGAATTTGTTGCA
TGATAACCAATGCAGATTTGGTACCTTTGACAATGCTGATTATTGTGAGGGCAATCACT
ATTCTTTCCATTTTTATAGATTGGACCCCTGCTTTGCTGGCGTATCCAG

Gen NP

>NP_377

AGCRAAAGCAGGGTAGATAATCACTCACTGAGTGACATCAACATCATGGCGTCTCAAGGCACCAAA
CGATCTTATGAACAGATGGAAACTGGTGGGGAACGCCAGAATGCCACTGAAATCAGAGCATCTGTT
GGGAGGATGGTTGGTGAATCGGGAGATTCTACATACAGATGTGCACCGAACTCAAGCTCAGTGA
CTACGAAGGGAGGCTGATCCAAAACAGCATAACCATAGAGAGGATGGTTCTCTCAGCATTGATGA
GAGGAGGAACAAATATCTGGAGGAGCATCCCAGTGCTGGGAAAGATCCCAAGAAAAGTGGAGGTC
CAATCTACAGGAGGAGAGATGGAAAATGGATGAGGGAAGTATCCTATATGACAAAAGAAGAGATCA
GAAGAATTTGGCGCAAGCGAATAACGGAGAAGACGCAACTGCTGGTCTCACTCATTTGATGATTT
GGCATTCCAATCTGAATGATGCCACATATCAGAGAACAAGGGCACTTGTACGTAAGTGGATGGATC
CCAGGATGTGCTCTCTGATGCAAGGTTCAACTCTTCCGAGGAGATCTGGAGCTGCTGGAGCGGCA
GTGAAAGGGGTTGGAACAATGGTATGGAGTTGATCCGGATGATCAAGAGAGGAATCAATGACAG
GAATTTCTGGAGAGGGCGAAAATGGACGGAGAACGAGAATCGCTTACGAAAAGAATGTGTAACATCCT
CAAGGGGAAATTCCAACAGCAGCACAAACGAGCAATGATGGACCAAGTGAAGAGAAAAGCCGGAATC
CTGGGAATGCTGAGATTGAGGATCTCATCTTCTAGCACGGTCTGCTCTCATCCTGAGGGGATCAG
TGGCTCATAAGTCCCTGCCTGCCTGCTTGTGTGATGGACTTGCAGGAGGCAAGTGGATACGACTTTG
AAAGAGAGGGATACTCCCTGGTCGGGATTGACCCCTTCCGTTTGTCCAGAACAGTCAAGTCTTCA
GTCTCATCAGACCAAATGAAAACCCAGCACACAAAAGTCAACTGGTTTGGATGGCATGCCACTCTG
CTGCATTTGAAGATCTGAGGGTATCAAGCTTTCATCAGAGGAACAAGAGTAGTCCCAAGAGGACAAC
TGTCCACCAGAGGAGTTCAAATTGCTTCAAATGAGAACATGGAGACAATGGACTCCAGTACTCTTGA
GCTAAGAAGCAGATACTGGGCTATAAGGACAAGGAGTGGAGGAAACACTAACCAACAGAGAGCAT
CTGCAGGGCAAATCAGCGTACAGCCCACATTCTGTACAGAGAAACCTCCCATTTGAGAGAGCAA
CCATCATGGCAGCATTACAGGAAACACTGAAGGCAGAACTTCTGACATGAGGACTGAGATCATAA
GAATGATGGAAAATGCCAGACCTGAAGATGTGTCTTTCCAGGGGCGGGGAGTCTTCGAGCTCTCG
GACGAAAAGGCAACGAACCCGATCGTGCCTTCTTTGACATGAGTAATGAAGGATCTTATTTCTTCC
GAGACAATGCAGAGGAGTATGACAATTAAGAAAAATACCCTTGTCTTCTACYCCGCATCAGGT

Gen NA

>NA_377

```
TGATCTGGATACGCCAGCAAAGCAGGAGTGAAAATGAATCCAAATCAGAAAATAATAAC
AATTGGCTCTGTCTCTCTGACCATTGCAACAGTATGTCTCCTCATGCAGATTGCCATCCT
AGCGACGACTGTGACATTGCATTTCAAGCAAATGAATGCAGCATCCCCCAAACAATCA
AGTGATGCCATGTGAACCAATCATAATAGAAAAGAACATAACAGAGATAGTGTATTTGAA
TAACACTACCATAGAAAAAGAAATTTGTCTGAAGTACCAGAATACAGGAATTGGTCGAA
ACCGCAGTGTGAGATTACAGGGTTGCTCCTTTCTCCAAGGACAACTCGATTCCGGCTTTC
TGCTGGTGGGGACATTTGGGTAACAAGAGAACCCTTATGTGTCATGCAGTCCCGGCAAATG
TTATCAGTTTGCACCTGGACAGGGACCACGCTGAACAATAAACTCAAACGGTACAAT
ACATGATAGGATCCACACCCGAACCCTTTTAATGAGTGAATTGGGTGTTCCGTTTCATTT
GGGAACCAAACAAGTGTGCATAGCATGGTCCAGCTCAAGTTGCCATGATGGGAAGGCATG
GTTGCATGTCTGTGTCACCTGGGGATGATAGAAATGCAACTGCTAGTTTCATTTATGATGG
GATGTTGTTGATAGTATTGGTTCATGGTCTCAAAATATCCTCAGGACTCAGGAGTCAGA
ATGTGTTTGCATCAATGGAACCTGTACAGTAGTAATGACTGATGGAAGTGCATCAGGAAG
GGCCGATACTAGAATACTATTTCGTTAAAGAAGGGAAAATTATTCATATTAGCCATTGTC
AGGAAGTGCTCAGCATATAGAGGAATGTTCTGTTATCCCCGATATCCAGATGTTAGATG
TGTTTGCAGAGATAACTGGAAGGGCTCTAATAGACCCGTCATAGATATAAATATGGCAGA
TTACAGCATTGATTCCAGTTATGTATGTTCCAGGGCTTGTGGTGACACACCTAGGAATGA
TGATAGCTCTAGCAGCAGCAACTGCAGAGATCCTAACAATGAGAGAGGGAAACCCAGGGGT
GAAAGGGTGGGCATTTGACAATGGGAATGATGTTTGGATGGGAAGAACAATCAGCAAAGA
TTCGCGCTCAGGTTATGAGACCTTCAGAGTCACCGATGGTTGGACCACGGCCAATTCTAA
GTCACAGGTCAATAGACAAAATTATAGTTGACAATAATAACTGGTCCGGTTATTCTGGTAT
TTTCTCTGTTGAGGGCAAAGCTGCATCAATAGGTGTTTTTATGTGGAGTTAATAAGAGG
GAGGCCACAGGAGACCAGGGTGTGGTGGACTTCGAATAGTATCGTCTGTTTTGTGGTAC
TTCTGGTACTTATGGAACAGGCTCATGGCCTGATGGAGCGAATATCAACTTCATGCCTAT
ATAAGCTTTCGCAATTTTAGAAAAACTCCTTGTTTCTACTCCGCATCAGGTC
```

Gen M

>M_377

```
GACCTGATGCGGAGTAGAAACAAGGTAGTTTTTTACTCCAGCTCTATGTTGACAAAATGA
CCATCGTCAACATCCACAGCACTCTGCTGTTCCCTGCCGATATTCTTCCCTCATAGACTCA
GGCACTCCTTCCGTAGAAGGCCCTCTTTTCAAACCGTATTTAAGGCGACGATAAATGCAT
TTGAAGAAAAGACGATCAAGAATCCACAATATCAAGTGAAGATCCCAATGATACTTGCG
GCAATAACGAGAGGATCACTTGAATCGCTGCATTTGCACTCCCATCCGTTTCTGGTAGGC
CTGCAAATTTTCAAGAAGATCATCTTTCAGACCAGCACTGGAGCTAGGATGAGTCCCAAT
GGTCCCTCATTGCCTGCACCATCTGCCTAGCCTGACTAGCAACCTCCATAGCCTCTGCTGC
CTGCTCACTTGACCCTGCCATTTGCTCCATGGCCTTAGCTGTAGTACTGGCCAGTACCAT
CCTGTTTTCATGCCTGATTAGTGGATTGGTTGTTGTCAACATTTGTCTGTGAGACCGATG
CTGGGAATCAGCAATCTGCTCACACGTGGCACACACCAGGCCAAATGCCACTTCAGTGGT
CACAGTCCCCATCCTGTTGTATATGAGGCCCATGCAGCTGGCAAGTGCACCAGTTGAATA
ACTGAGTGCCACCTCTTTTGGCCCATGGAATGTTATTTCCCTCTTGAGCTTCTGTACAG
TTTACTGCTCTGTCCATGTTGTTGGATCCCCATTCCCATTAAGGGCATTTTGGACAAA
GCGTCTACGCTGCAGTCCCTCGCTCACTGGGCACGGTGAACACAAATCCTAAAAT
CCCCTTAGTCAGAGGTGACAGGATTGGTCTTGTCTTTAGCCATTCCATGAGCGCCTCAAG
ATCGGTGTTTTTCCCTGCAAACACATCTTCAAGTCTCTGCGCGATCTCGGCTTTGAGGGG
CCTGACGGGACGATAGAGAGAACGTACGTTTCGACCTCGGTTAGAAGACTCATCTTTCAA
TATCTACCTGCTTTCGCTGGCGTATCCAG
```

Gen NS

>NS_377

```
GACCTGATGCGGAGTAGAAACAAGGGTGTTTTTTAGTACTAAATAAGCTGAAAAGAGAAT
GTCCTTATCTCACTCTCAACTTCAAGTAAGAGTTGCAATGCCTGTAGGAACGTTATCTGC
TCGAAGCTGTTCTCAGTTTTGGTTAATATGTTTCTGCATTCTGCAATTAACCATCTGATC
TCCTCAAACCTTCTGACTCAATTCTTCTCGCCATGTAGCGTTTCTGCTTTGGAGGGAGTGG
AGGTCCCCCATTCTCATCACGACTCCCCAAGCGAATCTCTGTATATTTTCAGACGCTCG
AATTGAGTTATCATTCCATTCAAGTCCACCGATGAGGATTCCAATTGCATTTTTGACATC
CTCTGTAGAATGTCCTGGCATGGAAGGAATGGGAGATATTTTCAGCTACAATGGCGCCATC
GTCTGTGAAAGCCCTCAGTGAGACTAATGTCTCCAGTTGATCAAATAGGACAGAGAAGTT
CGCCTTAAGTATTATTCTCTTGTCCATAATGGCCTGATCCATCTTCACCATCAGGCCCCC
TGTTATTTTCTGCCTTGGCATGAGCATGTACCATTCCCTGCTTATTTCCCTCTATGCTCAT
ATCGGTAATGTACCGAGGAGCAGGGCTGGATGCAATGGCAATTTTGAGATTTTCATCCGT
TTCGCTCTTTAAGATGTCTTCAACAATCTTTTTGCCTTCCATCGTGGCCACTCGCAGGTC
GAGTCCAAGTGTGCTGCCTCTTCCCTTTAATGCCTTTTGATCTTCTGAGTCTATCATC
AAAGGGAGCATCACACATGTCTCTCATGCTGAGCAGCTTTCTTATGTGCCATAAATAGCA
ATCTACCTGAAACGAGGTTATCGTGTTGGAATCCATTATGTTTTGTCACCCTGCTTTTG
CTGGCGTATCCAGATCA
```

Anexo 2. Árboles filogenéticos de los VIA aislados en ocho muestras de patos migratorios

Figura 6. Árboles filogenéticos de los VIA H5N2 relacionados con subtipos porcinos y aviáres.

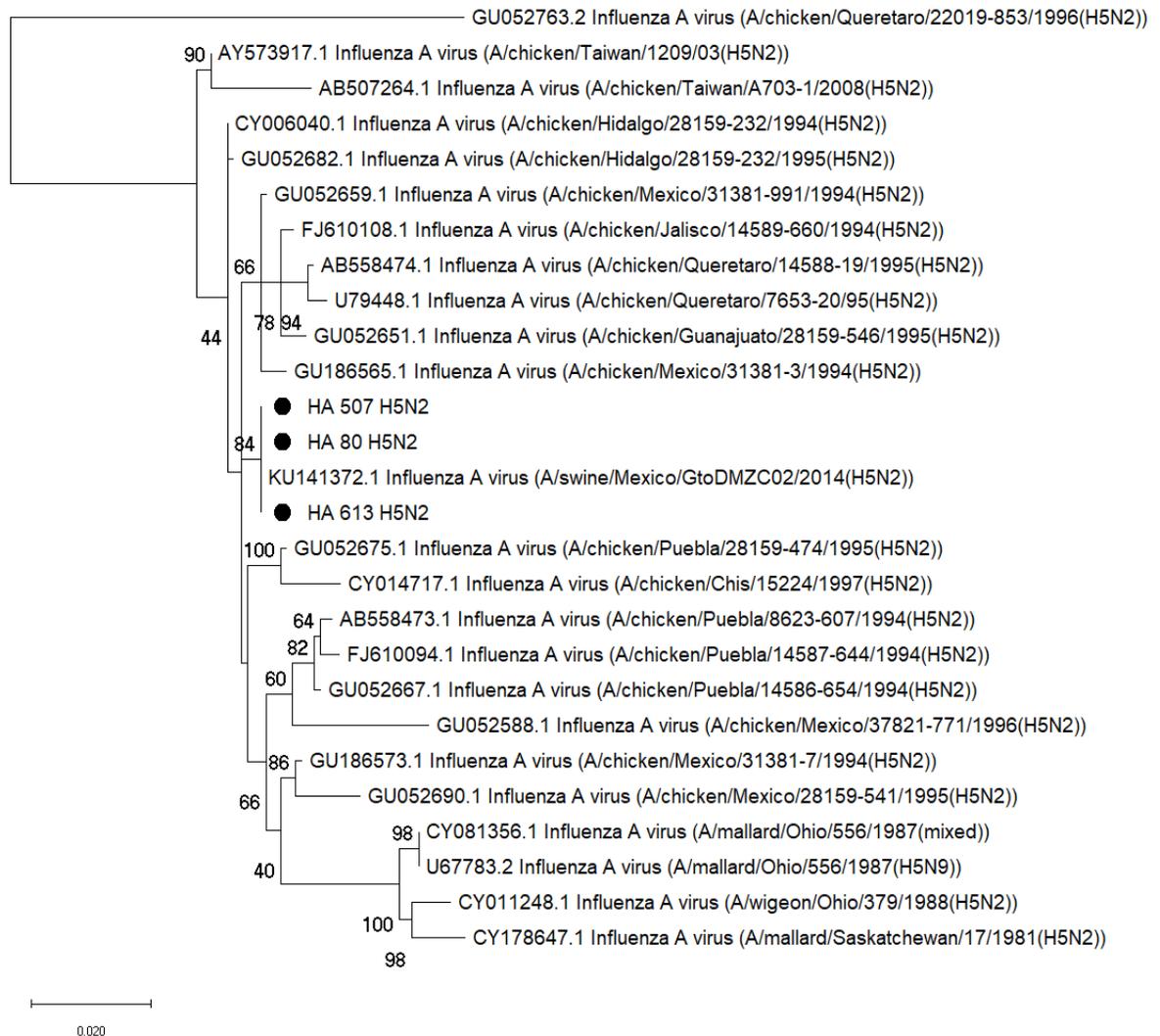


Figura 6 A. Árbol filogenético construido con el algoritmo Máxima verosimilitud del gen HA de los VIA H5N2 aislados a partir de *Anas crecca* (muestra 80), *Spatula discors* (muestra 507) y *Spatula clypeata* (muestra 613). Análisis filogenético molecular por el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo GTR. Se realizaron búsquedas con el método heurístico *Subtree Pruning & Regrafting* (SPR) y como prueba de la filogenia se utilizó el método de Booststrap, con 1000 réplicas. El porcentaje de los árboles en los cuales los genes asociados se agrupan se muestra al lado de los brazos. El análisis involucró 25 secuencias de nucleótidos. La secuencia identificada en este estudio está indicada con los círculos negros.

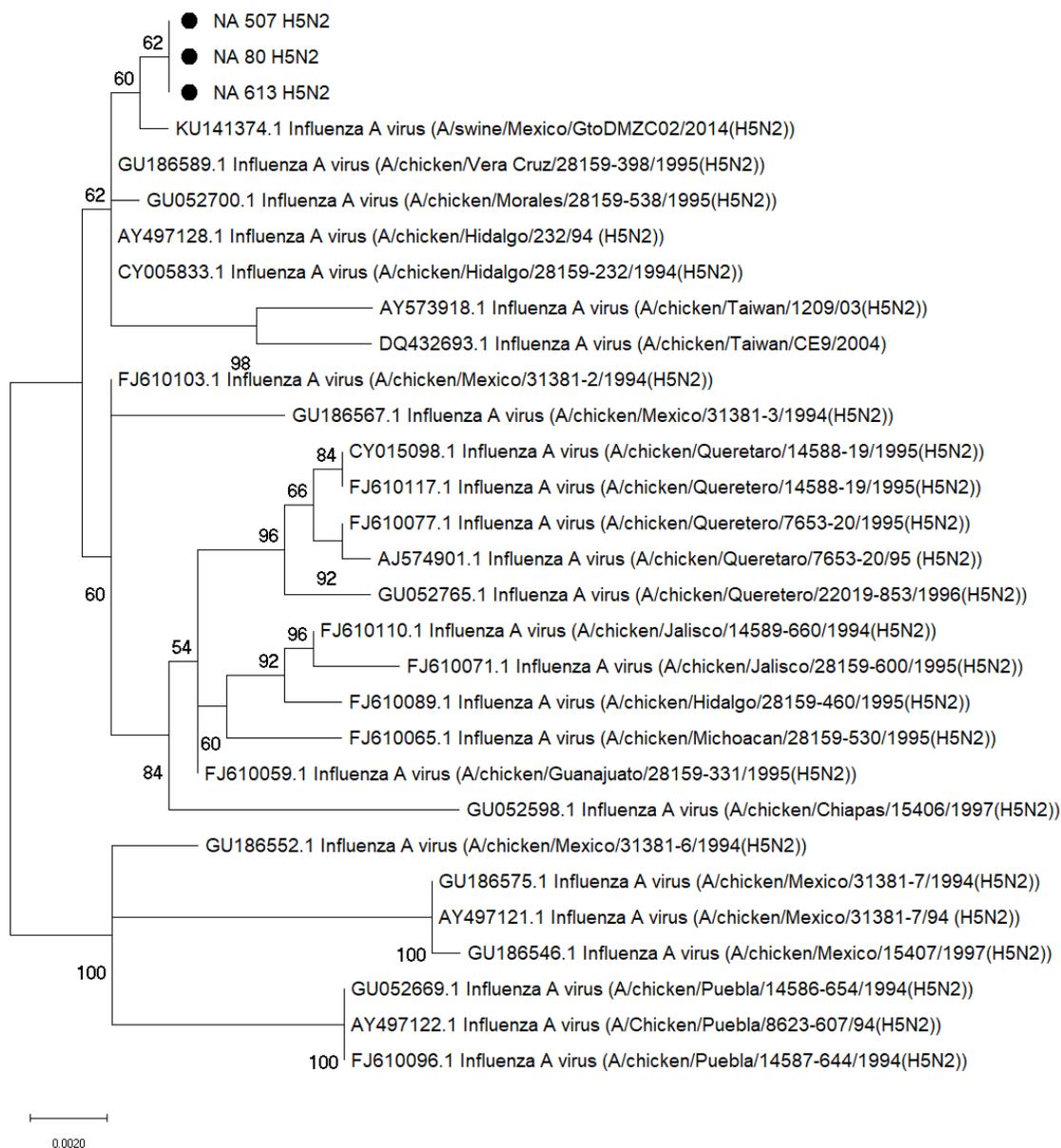


Figura 6 B. Árbol filogenético construido con el algoritmo Máxima verosimilitud del gen **NA** de los VIA **H5N2** aislados a partir de **Anas crecca (muestra 80)**, **Spatula discors (muestra 507)** y **Spatula clypeata (muestra 613)**. Análisis filogenético molecular por el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo GTR. Se realizaron búsquedas con el método heurístico *Subtree Pruning & Regrafting* (SPR) y como prueba de la filogenia se utilizó el método de Booststrap, con 1000 réplicas. El porcentaje de los árboles en los cuales los genes asociados se agrupan se muestra al lado de los brazos. El análisis involucró 25 secuencias de nucleótidos. La secuencia identificada en este estudio está indicada con los círculos negros.

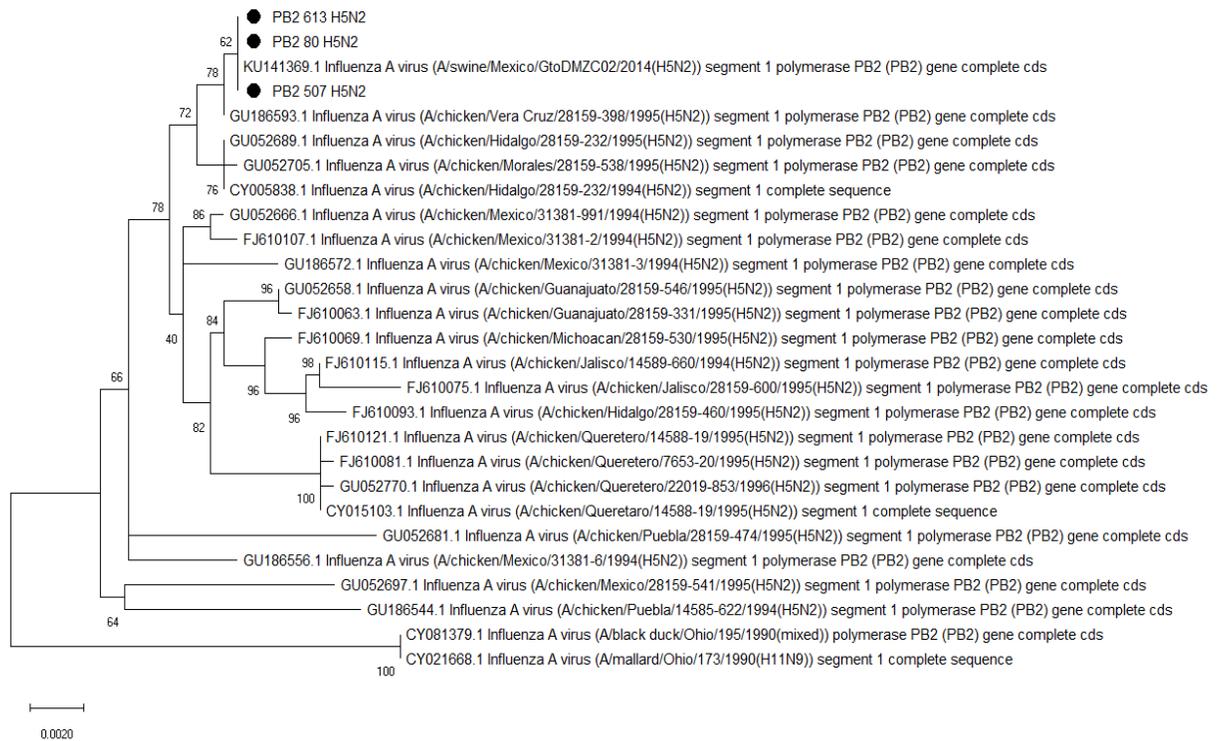


Figura 6 C. Árbol filogenético construido con el algoritmo Máxima verosimilitud del gen **PB2** de los VIA **H5N2** aislados a partir de **Anas crecca** (muestra 80), **Spatula discors** (muestra 507) y **Spatula clypeata** (muestra 613). Análisis filogenético molecular por el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo GTR. Se realizaron búsquedas con el método heurístico *Subtree Pruning & Regrafting* (SPR) y como prueba de la filogenia se utilizó el método de Booststrap, con 1000 réplicas. El porcentaje de los árboles en los cuales los genes asociados se agrupan se muestra al lado de los brazos. El análisis involucró 25 secuencias de nucleótidos. La secuencia identificada en este estudio está indicada con los círculos negros.

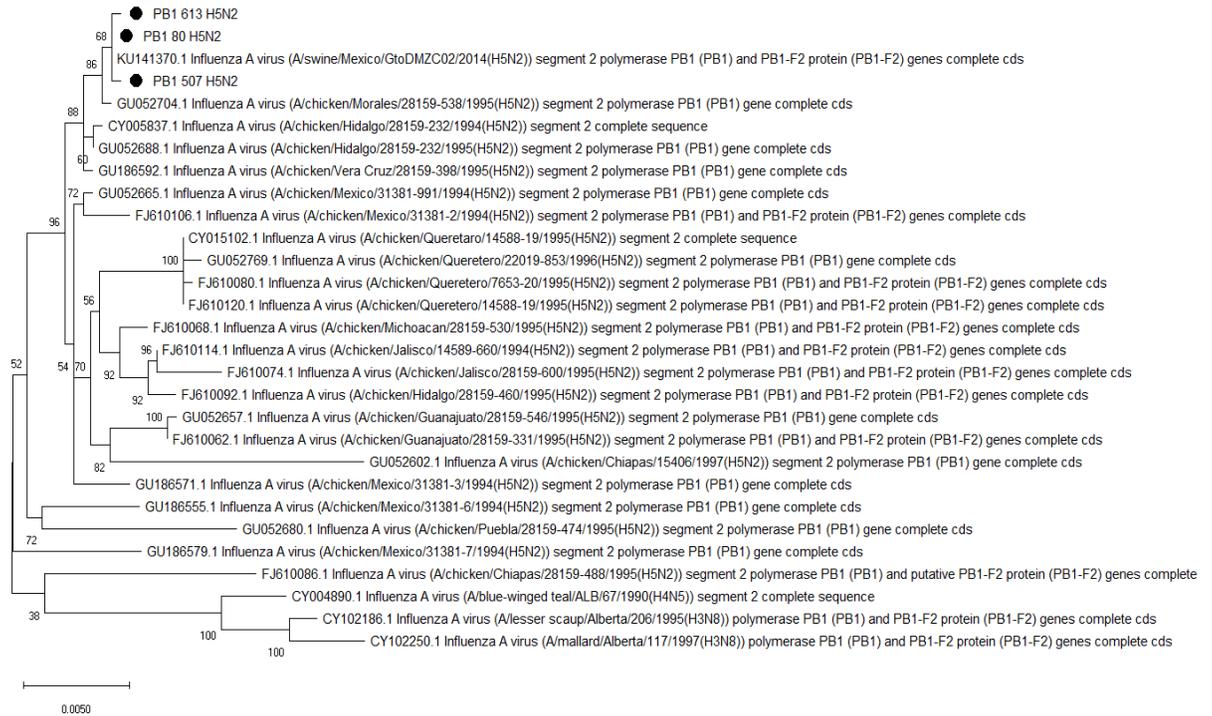


Figura 6 D. Árbol filogenético construido con el algoritmo Máxima verosimilitud del gen **PB1** de los VIA **H5N2** aislados a partir de **Anas crecca** (muestra 80), **Spatula discors** (muestra 507) y **Spatula clypeata** (muestra 613). Análisis filogenético molecular por el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo GTR. Se realizaron búsquedas con el método heurístico *Subtree Pruning & Regrafting* (SPR) y como prueba de la filogenia se utilizó el método de Booststrap, con 1000 réplicas. El porcentaje de los árboles en los cuales los genes asociados se agrupan se muestra al lado de los brazos. El análisis involucró 25 secuencias de nucleótidos. La secuencia identificada en este estudio está indicada con los círculos negros.

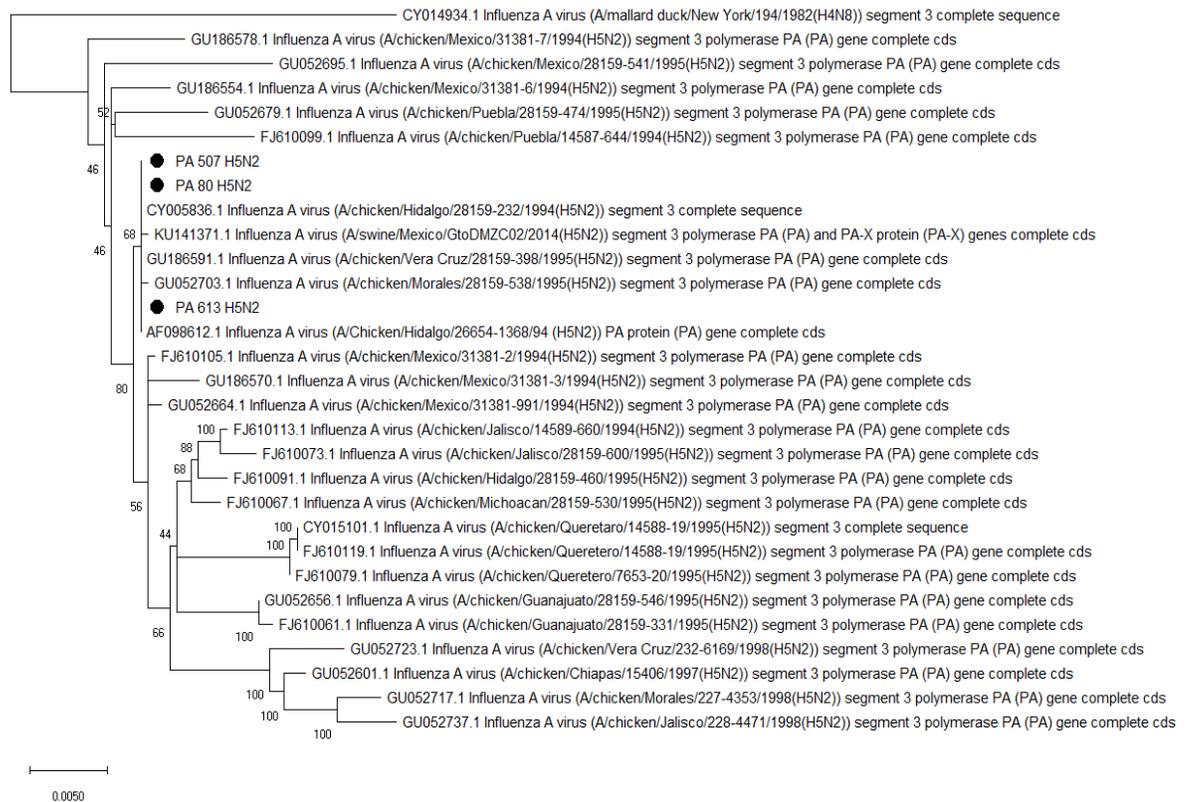


Figura 6 E. Árbol filogenético construido con el algoritmo Máxima verosimilitud del gen PA de los VIA H5N2 aislados a partir de *Anas crecca* (muestra 80), *Spatula discors* (muestra 507) y *Spatula clypeata* (muestra 613). Análisis filogenético molecular por el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo GTR. Se realizaron búsquedas con el método heurístico *Subtree Pruning & Regrafting* (SPR) y como prueba de la filogenia se utilizó el método de Booststrap, con 1000 réplicas. El porcentaje de los árboles en los cuales los genes asociados se agrupan se muestra al lado de los brazos. El análisis involucró 25 secuencias de nucleótidos. La secuencia identificada en este estudio está indicada con los círculos negros.



Figura 6 F. Árbol filogenético construido con el algoritmo Máxima verosimilitud del gen NP de los VIA H5N2 aislados a partir de *Anas crecca* (muestra 80), *Spatula discors* (muestra 507) y *Spatula clypeata* (muestra 613). Análisis filogenético molecular por el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo GTR. Se realizaron búsquedas con el método heurístico *Subtree Pruning & Regrafting* (SPR) y como prueba de la filogenia se utilizó el método de Booststrap, con 1000 réplicas. El porcentaje de los árboles en los cuales los genes asociados se agrupan se muestra al lado de los brazos. El análisis involucró 25 secuencias de nucleótidos. La secuencia identificada en este estudio está indicada con los círculos negros.



Figura 6 G. Árbol filogenético construido con el algoritmo Máxima verosimilitud del gen **M** de los VIA **H5N2** aislados a partir de **Anas crecca** (muestra 80), **Spatula discors** (muestra 507) y **Spatula clypeata** (muestra 613). Análisis filogenético molecular por el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo GTR. Se realizaron búsquedas con el método heurístico *Subtree Pruning & Regrafting* (SPR) y como prueba de la filogenia se utilizó el método de Booststrap, con 1000 réplicas. El porcentaje de los árboles en los cuales los genes asociados se agrupan se muestra al lado de los brazos. El análisis involucró 25 secuencias de nucleótidos. La secuencia identificada en este estudio está indicada con los círculos negros.

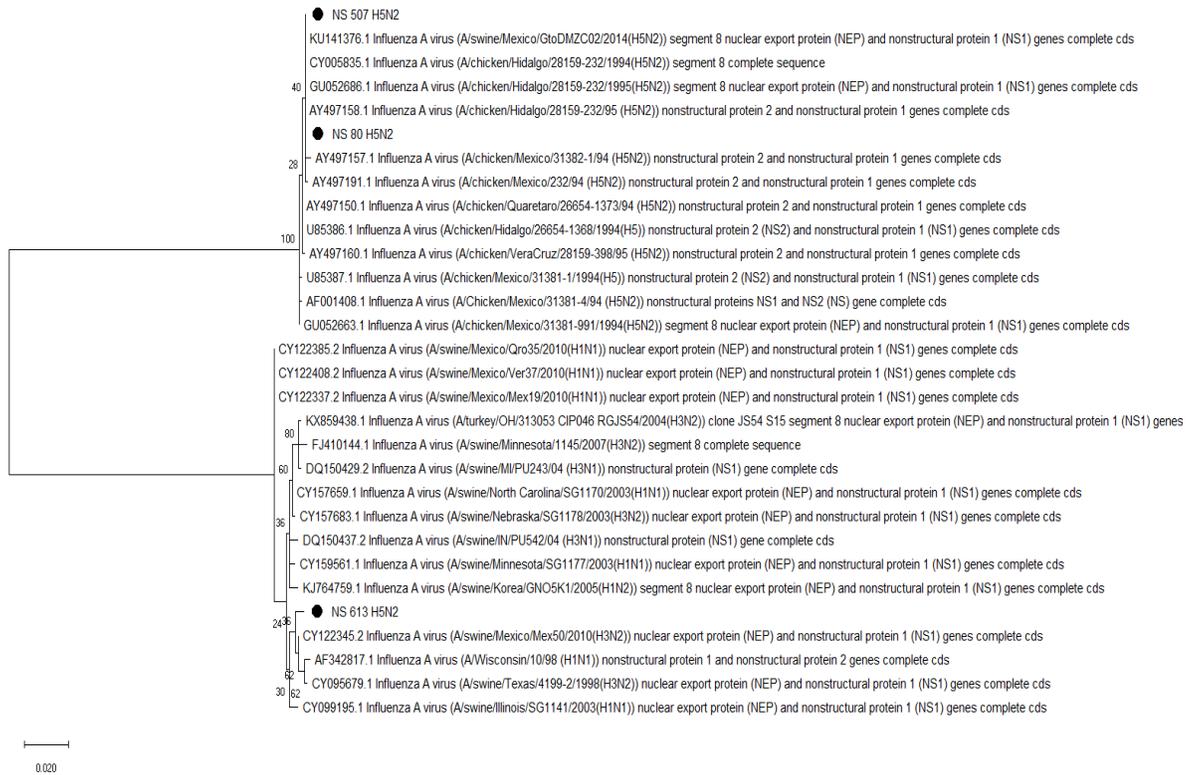


Figura 6 H. Árbol filogenético construido con el algoritmo Máxima verosimilitud del gen NS de los VIA H5N2 aislados a partir de *Anas crecca* (muestra 80), *Spatula discors* (muestra 507) y *Spatula clypeata* (muestra 613). Análisis filogenético molecular por el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo GTR. Se realizaron búsquedas con el método heurístico *Subtree Pruning & Regrafting* (SPR) y como prueba de la filogenia se utilizó el método de Booststrap, con 1000 réplicas. El porcentaje de los árboles en los cuales los genes asociados se agrupan se muestra al lado de los brazos. El análisis involucró 25 secuencias de nucleótidos. La secuencia identificada en este estudio está indicada con los círculos negros.

Figura 7. Árboles filogenéticos de los VIA H3N2 relacionados con subtipos porcinos.

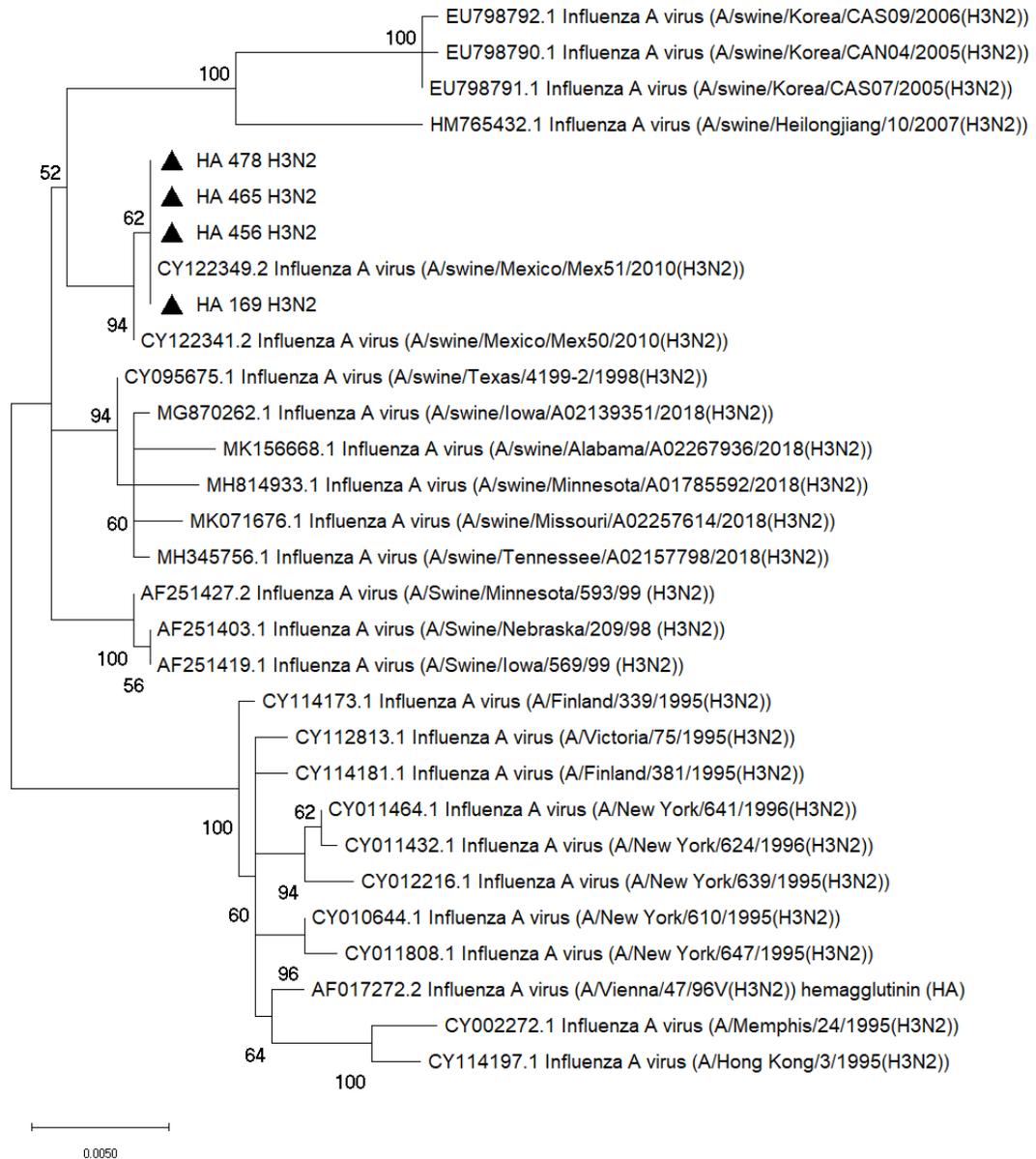


Figura 7 A. Árbol filogenético construido con el algoritmo Máxima verosimilitud del gen HA de los VIA H3N2 aislados a partir de *Anas crecca* (muestras 169, 456, 465) y *Spatula discors* (muestra 478). Análisis filogenético molecular por el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo GTR. Se realizaron búsquedas con el método heurístico *Subtree Pruning & Regrafting* (SPR) y como prueba de la filogenia se utilizó el método de Booststrap, con 1000 réplicas. El porcentaje de los árboles en los cuales los genes asociados se agrupan se muestra al lado de los brazos. El análisis involucró 25 secuencias de nucleótidos. Las secuencias identificadas en este estudio están indicadas con triángulos color negro.

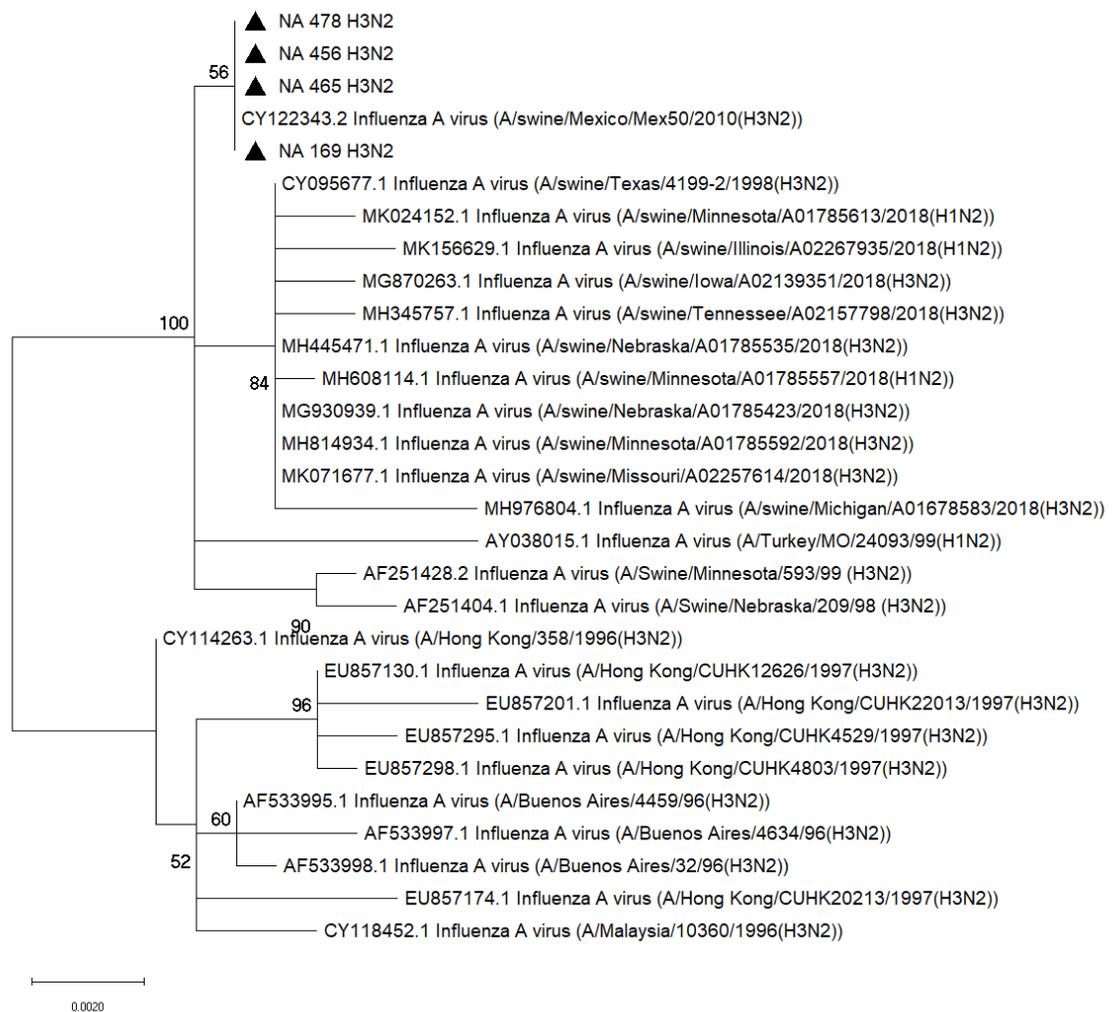


Figura 7 B. Árbol filogenético construido con el algoritmo Máxima verosimilitud del gen **NA** de los VIA **H3N2** aislados a partir de **Anas crecca** (muestras **169, 456, 465**) y **Spatula discors** (muestra **478**). Análisis filogenético molecular por el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo GTR. Se realizaron búsquedas con el método heurístico *Subtree Pruning & Regrafting* (SPR) y como prueba de la filogenia se utilizó el método de Booststrap, con 1000 réplicas. El porcentaje de los árboles en los cuales los genes asociados se agrupan se muestra al lado de los brazos. El análisis involucró 25 secuencias de nucleótidos. Las secuencias identificadas en este estudio están indicadas con triángulos color negro.

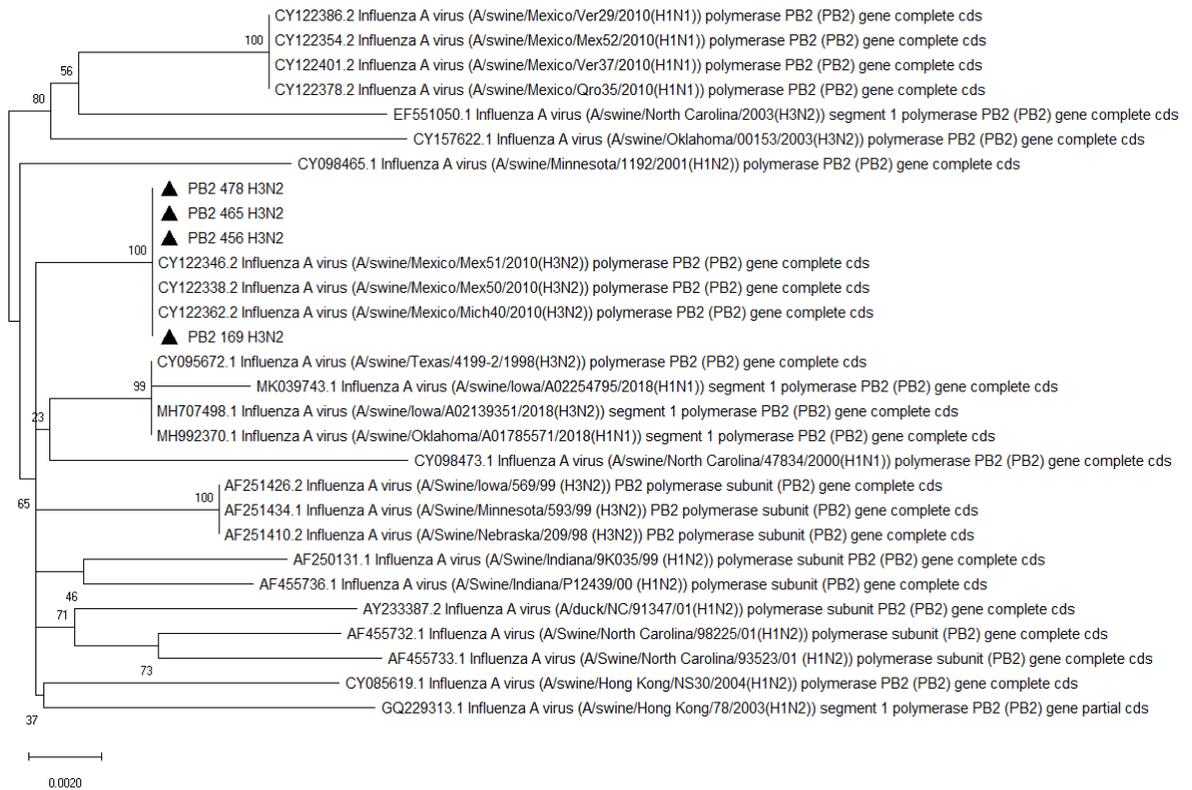


Figura 7 C. Árbol filogenético construido con el algoritmo Máxima verosimilitud del gen PB2 de los VIA H3N2 aislados a partir de *Anas crecca* (muestras 169, 456, 465) y *Spatula discors* (muestra 478). Análisis filogenético molecular por el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo GTR. Se realizaron búsquedas con el método heurístico *Subtree Pruning & Regrafting* (SPR) y como prueba de la filogenia se utilizó el método de Booststrap, con 1000 réplicas. El porcentaje de los árboles en los cuales los genes asociados se agrupan se muestra al lado de los brazos. El análisis involucró 25 secuencias de nucleótidos. Las secuencias identificadas en este estudio están indicadas con triángulos color negro.

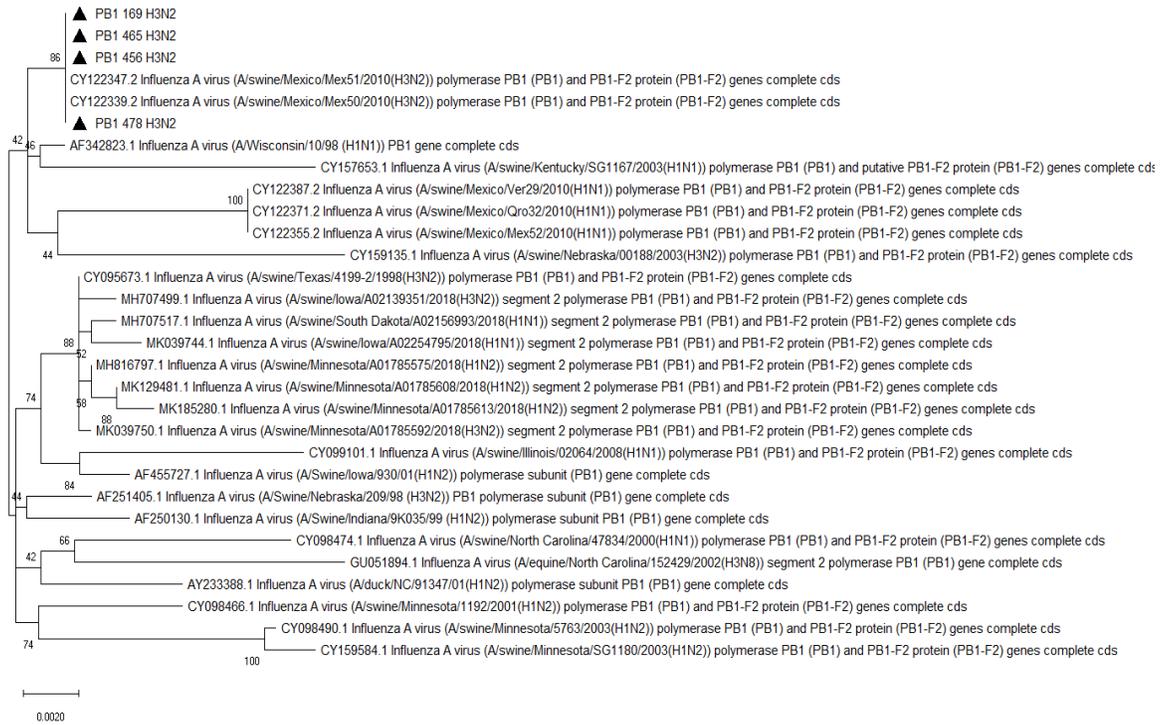


Figura 7 D. Árbol filogenético construido con el algoritmo Máxima verosimilitud del gen **PB1** de los VIA **H3N2** aislados a partir de **Anas crecca** (muestras **169, 456, 465**) y **Spatula discors** (muestra **478**). Análisis filogenético molecular por el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo GTR. Se realizaron búsquedas con el método heurístico *Subtree Pruning & Regrafting* (SPR) y como prueba de la filogenia se utilizó el método de Bootstrap, con 1000 réplicas. El porcentaje de los árboles en los cuales los genes asociados se agrupan se muestra al lado de los brazos. El análisis involucró 25 secuencias de nucleótidos. Las secuencias aisladas en este estudio están indicadas con triángulos color negro.

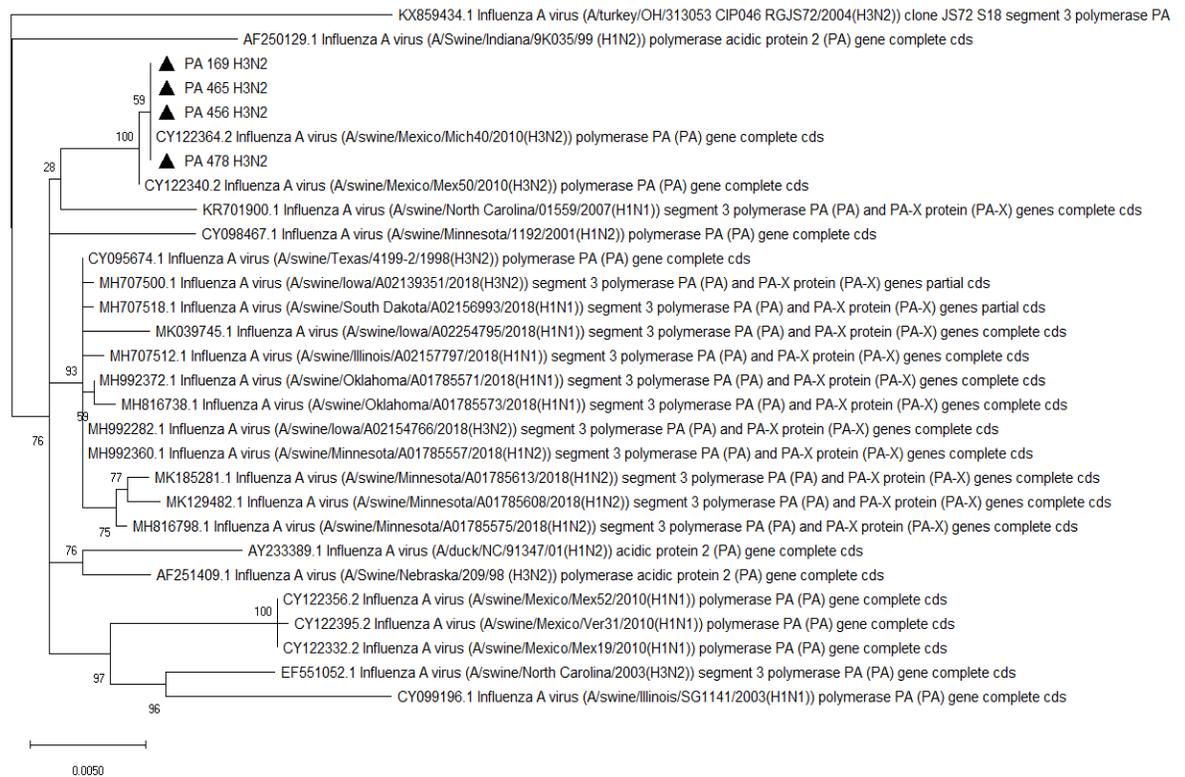


Figura 7 E. Árbol filogenético construido con el algoritmo Máxima verosimilitud del gen PA de los VIA H3N2 aislados a partir de *Anas crecca* (muestras 169, 456, 465) y *Spatula discors* (muestra 478). Análisis filogenético molecular por el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo GTR. Se realizaron búsquedas con el método heurístico *Subtree Pruning & Regrafting* (SPR) y como prueba de la filogenia se utilizó el método de Bootstrap, con 1000 réplicas. El porcentaje de los árboles en los cuales los genes asociados se agrupan se muestra al lado de los brazos. El análisis involucró 25 secuencias de nucleótidos. Las secuencias aisladas en este estudio están indicadas con triángulos color negro.

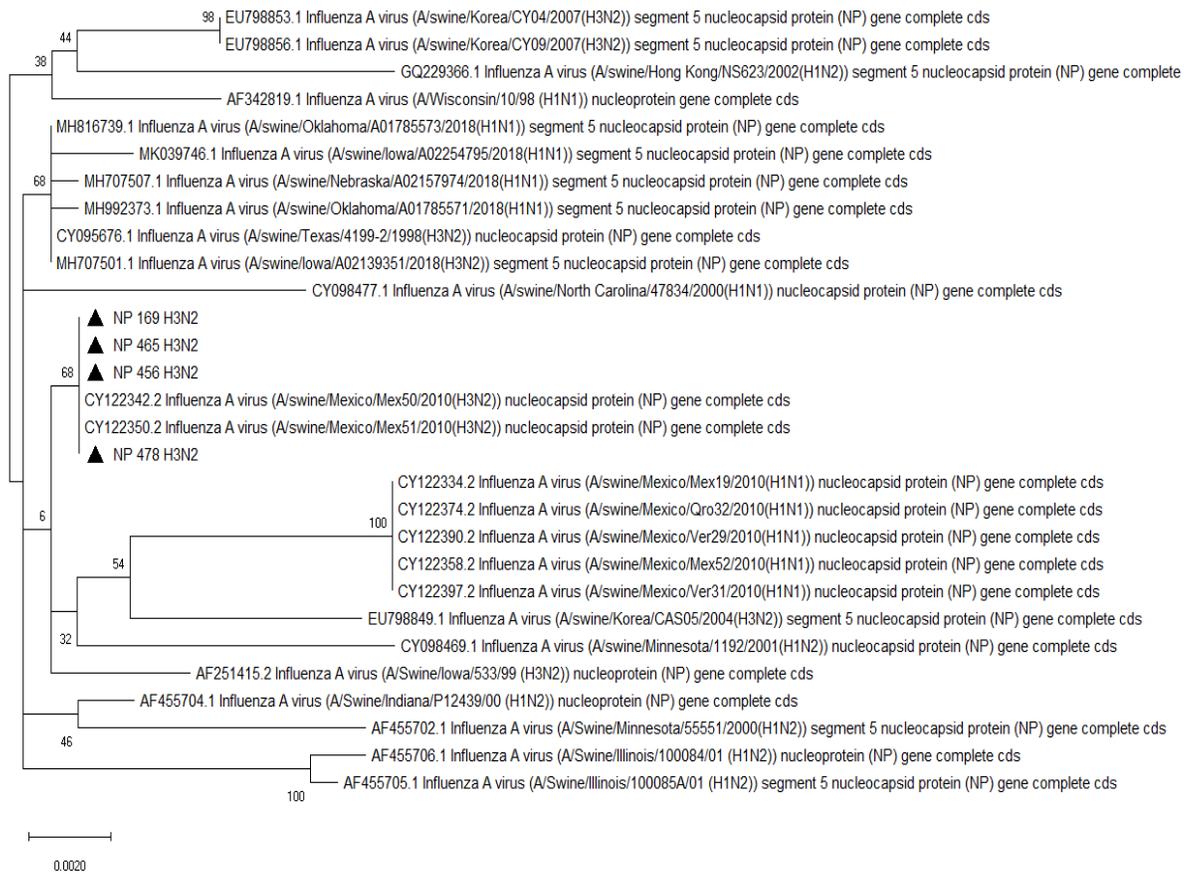


Figura 7 F. Árbol filogenético construido con el algoritmo Máxima verosimilitud del gen NP de los VIA H3N2 aislados a partir de *Anas crecca* (muestras 169, 456, 465) y *Spatula discors* (muestra 478). Análisis filogenético molecular por el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo GTR. Se realizaron búsquedas con el método heurístico *Subtree Pruning & Regrafting* (SPR) y como prueba de la filogenia se utilizó el método de Booststrap, con 1000 réplicas. El porcentaje de los árboles en los cuales los genes asociados se agrupan se muestra al lado de los brazos. El análisis involucró 25 secuencias de nucleótidos. Las secuencias aisladas en este estudio están indicadas con triángulos color negro.

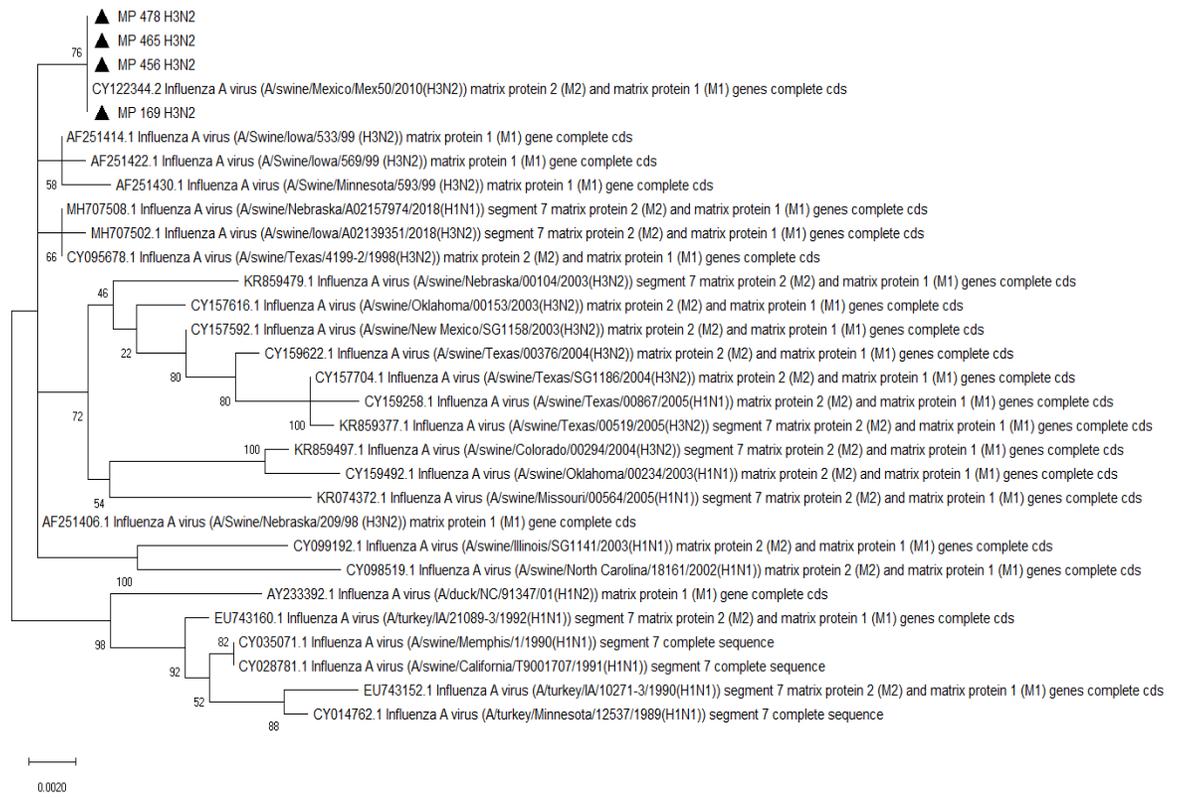


Figura 7 G. Árbol filogenético construido con el algoritmo Máxima verosimilitud del gen **M** de los VIA **H3N2** aislados a partir de **Anas crecca** (muestras **169, 456, 465**) y **Spatula discors** (muestra **478**). Análisis filogenético molecular por el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo GTR. Se realizaron búsquedas con el método heurístico *Subtree Pruning & Regrafting* (SPR) y como prueba de la filogenia se utilizó el método de Booststrap, con 1000 réplicas. El porcentaje de los árboles en los cuales los genes asociados se agrupan se muestra al lado de los brazos. El análisis involucró 25 secuencias de nucleótidos. Las secuencias aisladas en este estudio están indicadas con triángulos color negro.

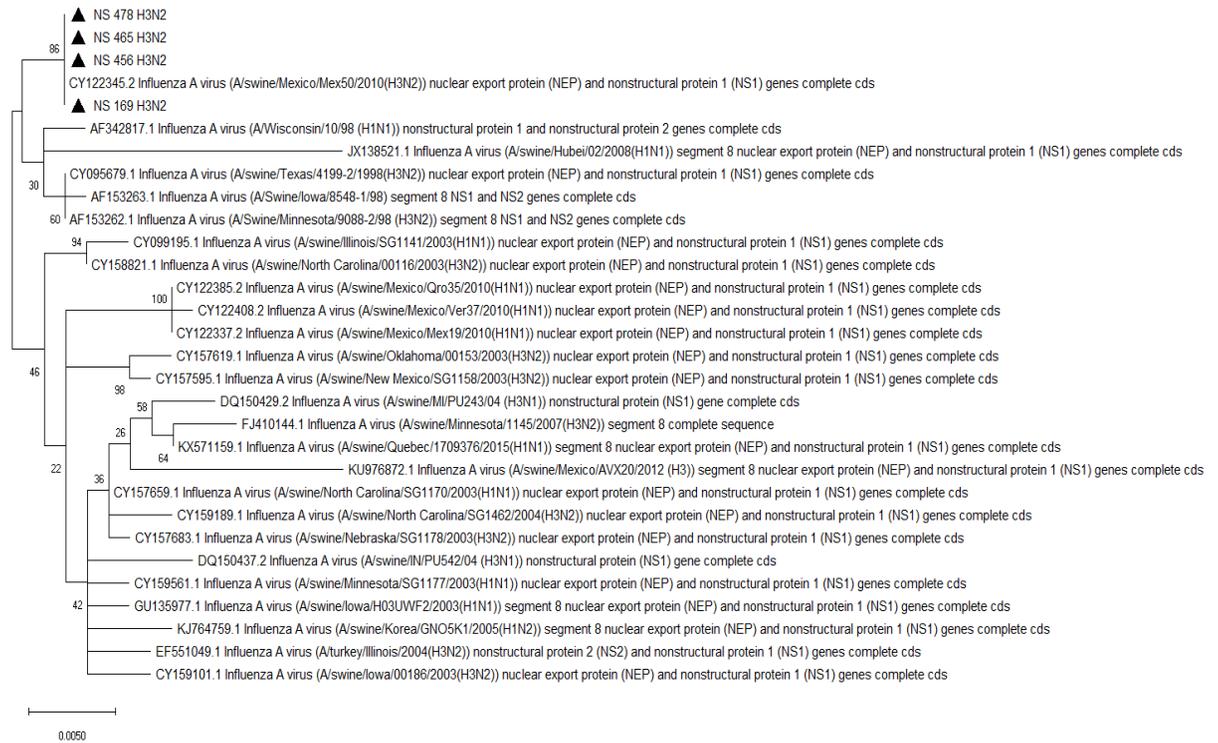


Figura 7 F. Árbol filogenético construido con el algoritmo Máxima verosimilitud del gen NS de los VIA H3N2 aislados a partir de *Anas crecca* (muestras 169, 456, 465) y *Spatula discors* (muestra 478). Análisis filogenético molecular por el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo GTR. Se realizaron búsquedas con el método heurístico *Subtree Pruning & Regrafting* (SPR) y como prueba de la filogenia se utilizó el método de Booststrap, con 1000 réplicas. El porcentaje de los árboles en los cuales los genes asociados se agrupan se muestra al lado de los brazos. El análisis involucró 25 secuencias de nucleótidos. Las secuencias aisladas en este estudio están indicadas con triángulos color negro.

Figura 8. Árboles filogenéticos del VIA H1N1 relacionado con subtipos porcinos.

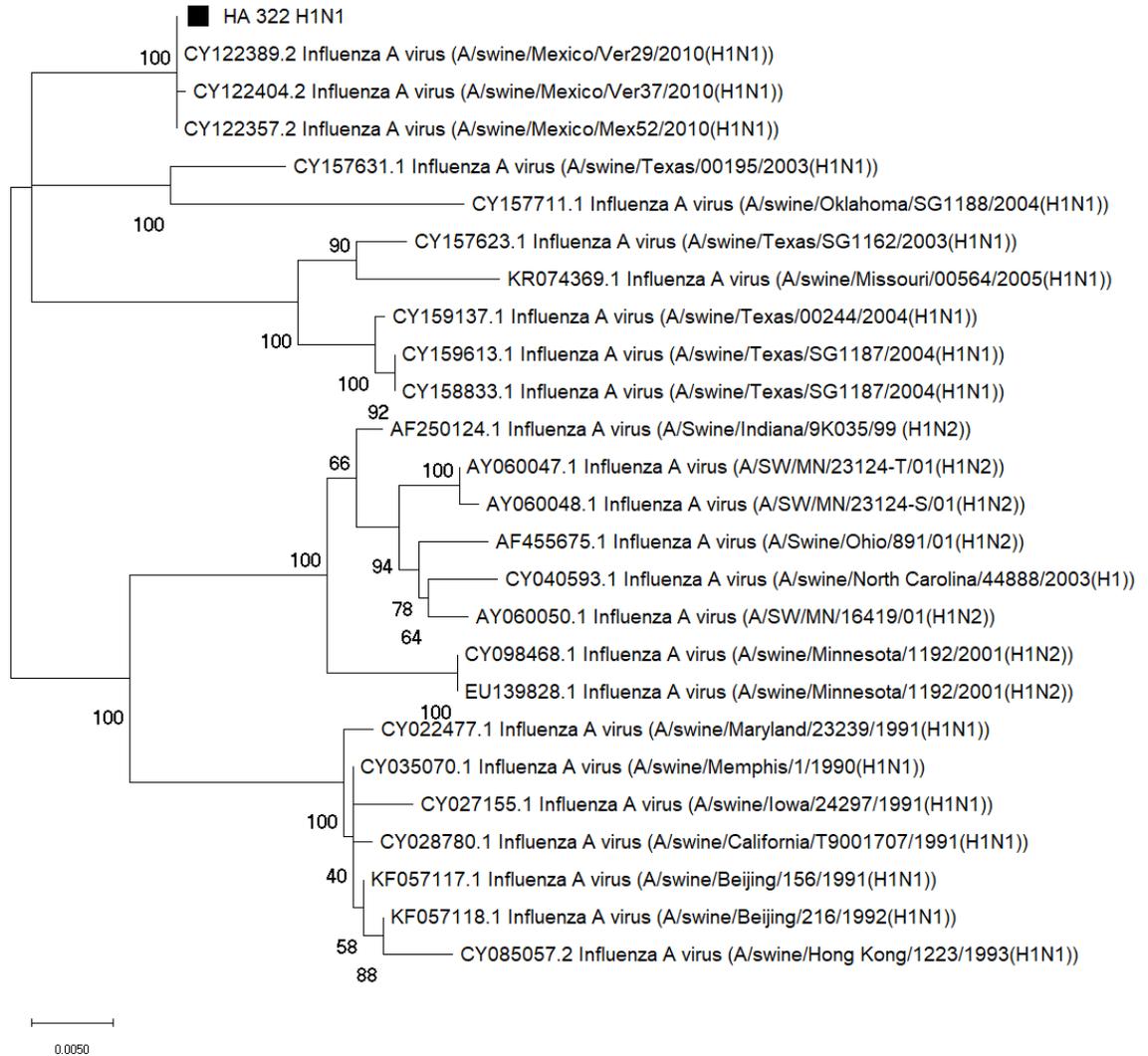


Figura 8 A. Árbol filogenético construido con el algoritmo Máxima verosimilitud del gen HA del VIA H1N1 aislado a partir *Spatula discors* (muestra 322). Análisis filogenético molecular por el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo GTR. Se realizaron búsquedas con el método heurístico *Subtree Pruning & Regrafting* (SPR) y como prueba de la filogenia se utilizó el método de Booststrap, con 1000 réplicas. El porcentaje de los árboles en los cuales los genes asociados se agrupan se muestra al lado de los brazos. El análisis involucró 25 secuencias de nucleótidos. La secuencia aislada en este estudio está indicada con un cuadrado color negro.

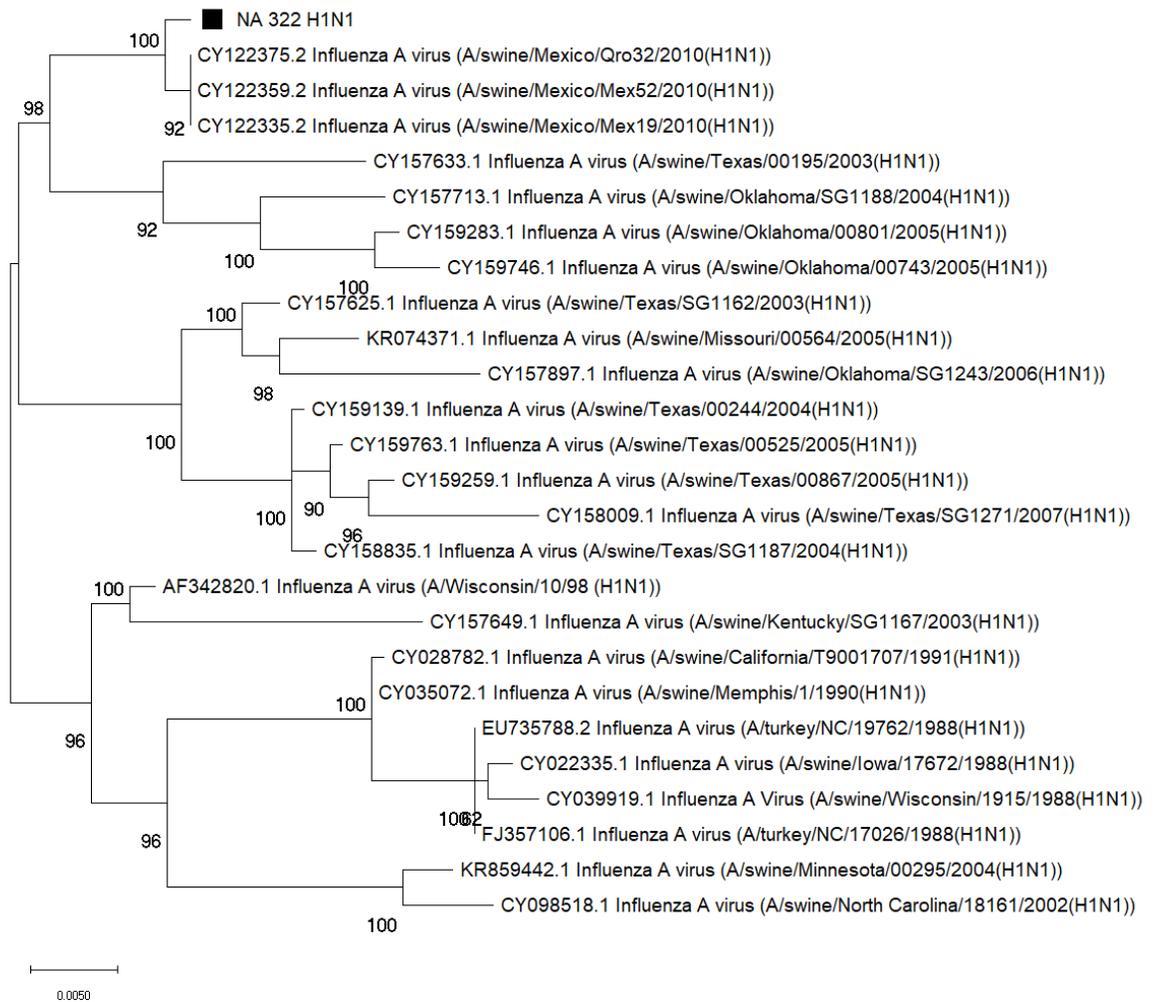


Figura 8 B. Árbol filogenético construido con el algoritmo Máxima verosimilitud del gen **NA** del VIA **H1N1** aislado a partir ***Spatula discors* (muestra 322)**. Análisis filogenético molecular por el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo GTR. Se realizaron búsquedas con el método heurístico *Subtree Pruning & Regrafting* (SPR) y como prueba de la filogenia se utilizó el método de Booststrap, con 1000 réplicas. El porcentaje de los árboles en los cuales los genes asociados se agrupan se muestra al lado de los brazos. El análisis involucró 25 secuencias de nucleótidos. La secuencia aislada en este estudio está indicada con un cuadrado color negro.



Figura 8 C. Árbol filogenético construido con el algoritmo Máxima verosimilitud del gen **PB2** del VIA **H1N1** aislado a partir ***Spatula discors*** (muestra 322). Análisis filogenético molecular por el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo GTR. Se realizaron búsquedas con el método heurístico *Subtree Pruning & Regrafting* (SPR) y como prueba de la filogenia se utilizó el método de Booststrap, con 1000 réplicas. El porcentaje de los árboles en los cuales los genes asociados se agrupan se muestra al lado de los brazos. El análisis involucró 25 secuencias de nucleótidos. La secuencia aislada en este estudio está indicada con un cuadrado color negro.

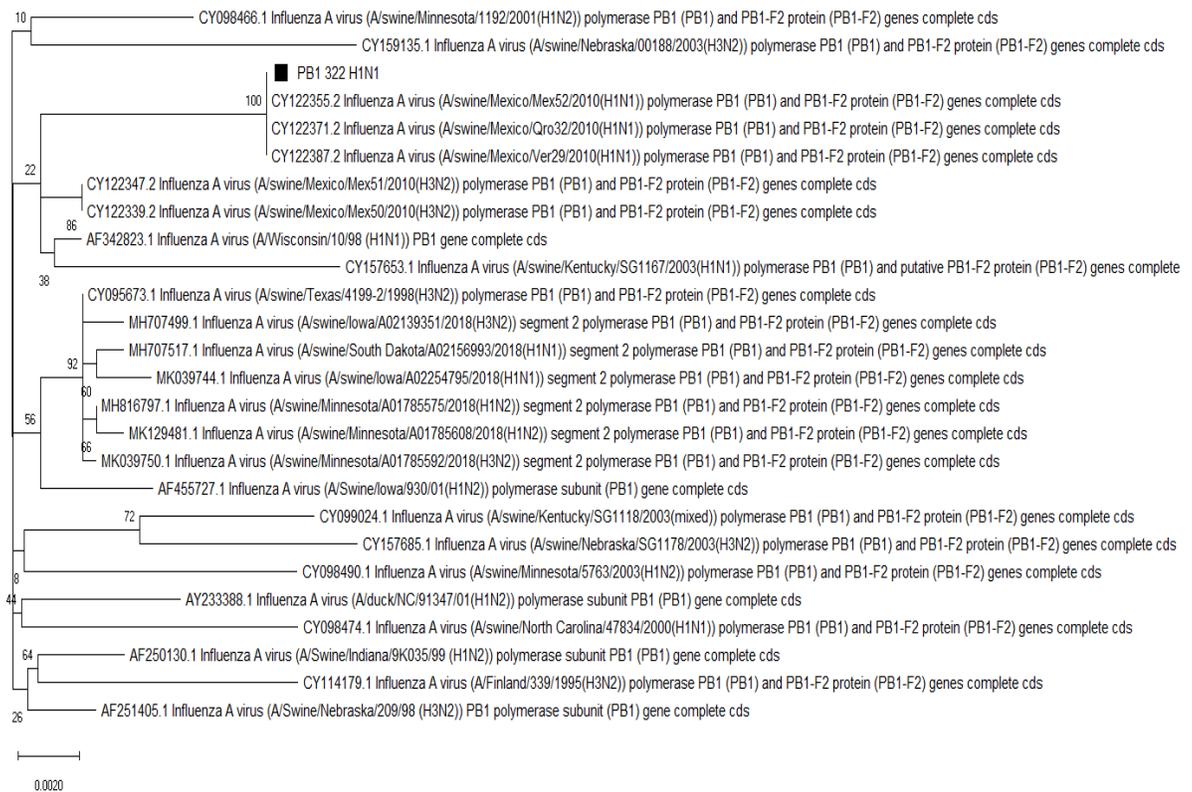


Figura 8 D. Árbol filogenético construido con el algoritmo Máxima verosimilitud del gen **PB1** del VIA **H1N1** aislado a partir ***Spatula discors*** (muestra 322). Análisis filogenético molecular por el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo GTR. Se realizaron búsquedas con el método heurístico *Subtree Pruning & Regrafting* (SPR) y como prueba de la filogenia se utilizó el método de Booststrap, con 1000 réplicas. El porcentaje de los árboles en los cuales los genes asociados se agrupan se muestra al lado de los brazos. El análisis involucró 25 secuencias de nucleótidos. La secuencia aislada en este estudio está indicada con un cuadrado color negro.



Figura 8 E. Árbol filogenético construido con el algoritmo Máxima verosimilitud del gen **PA** del VIA **H1N1** aislado a partir ***Spatula discors*** (muestra 322). Análisis filogenético molecular por el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo GTR. Se realizaron búsquedas con el método heurístico *Subtree Pruning & Regrafting* (SPR) y como prueba de la filogenia se utilizó el método de Booststrap, con 1000 réplicas. El porcentaje de los árboles en los cuales los genes asociados se agrupan se muestra al lado de los brazos. El análisis involucró 25 secuencias de nucleótidos. La secuencia aislada en este estudio está indicada con un cuadrado color negro.

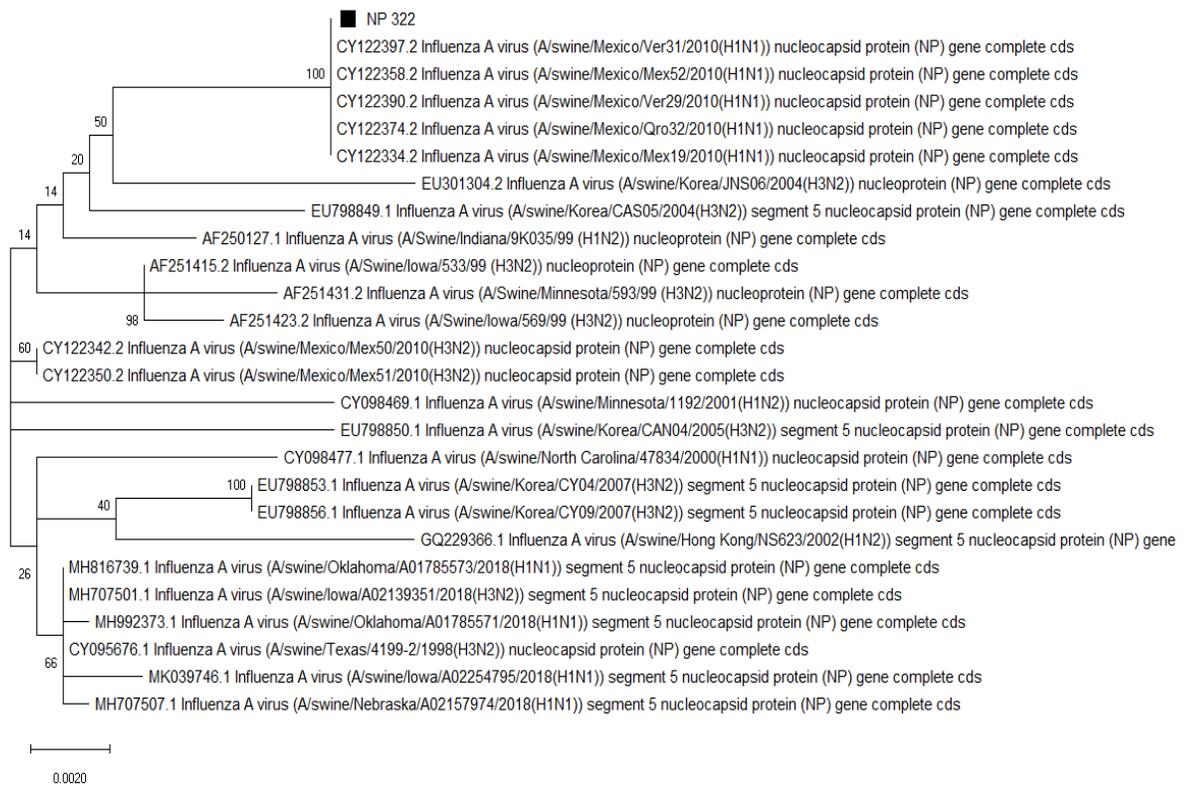


Figura 8 F. Árbol filogenético construido con el algoritmo Máxima verosimilitud del gen NP del VIA H1N1 aislado a partir *Spatula discors* (muestra 322). Análisis filogenético molecular por el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo GTR. Se realizaron búsquedas con el método heurístico *Subtree Pruning & Grafting* (SPR) y como prueba de la filogenia se utilizó el método de Booststrap, con 1000 réplicas. El porcentaje de los árboles en los cuales los genes asociados se agrupan se muestra al lado de los brazos. El análisis involucró 25 secuencias de nucleótidos. La secuencia aislada en este estudio está indicada con un cuadrado color negro.



Figura 8 G. Árbol filogenético construido con el algoritmo Máxima verosimilitud del gen **M** del VIA **H1N1** aislado a partir ***Spatula discors*** (muestra 322). Análisis filogenético molecular por el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo GTR. Se realizaron búsquedas con el método heurístico *Subtree Pruning & Regrafting* (SPR) y como prueba de la filogenia se utilizó el método de Booststrap, con 1000 réplicas. El porcentaje de los árboles en los cuales los genes asociados se agrupan se muestra al lado de los brazos. El análisis involucró 25 secuencias de nucleótidos. La secuencia aislada en este estudio está indicada con un cuadrado color negro.



Figura 8 H. Árbol filogenético construido con el algoritmo Máxima verosimilitud del gen **NS** del VIA **H1N1** aislado a partir ***Spatula discors* (muestra 322)**. Análisis filogenético molecular por el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo GTR. Se realizaron búsquedas con el método heurístico *Subtree Pruning & Regrafting* (SPR) y como prueba de la filogenia se utilizó el método de Booststrap, con 1000 réplicas. El porcentaje de los árboles en los cuales los genes asociados se agrupan se muestra al lado de los brazos. El análisis involucró 25 secuencias de nucleótidos. La secuencia aislada en este estudio está indicada con un cuadrado color negro.

Anexo 3. Eventos microestructurales en las secuencias obtenidas en patos migratorios

MX: Sequence Data Explorer

Data Display Search Groups Highlight Statistics Help

MEGA X X3 TA UUC Phe C V Pi S 0 2 4 ★ NAME MOTF

✓ Name	C	G	T	C	C	C	G	T	C	A	-	G	C	C	C	C	C	T
✓ 1. M 507 H5N2
✓ 2. M 613 H5N2
✓ 3. M 80 H5N2	G
✓ 4. KU141375.1 (A/swine/Mexico/GtoDMZC02/2014(H5N2))	G
✓ 5. CY005832.1 Influenza A virus (A/chicken/Hidalgo/28159-	G

MX: Sequence Data Explorer

Data Display Search Groups Highlight Statistics Help

MEGA X X3 TA UUC Phe C V Pi S 0 2 4 ★ NAME MOTF

✓ Name	R	G	R	N	V	R	S	L	Y	R	P	V	-	P	P	Q	S	R
✓ 1. M 507 H5N2
✓ 2. M 613 H5N2
✓ 3. M 80 H5N2	R
✓ 4. KU141375.1 (A/swine/Mexico/GtoDMZC02/2014(H5N2))	R
✓ 5. CY005832.1 Influenza A virus (A/chicken/Hidalgo/28159-	R

Figura 9. Presencia de un gap en el gen M del virus H5N2 aislado en patos migratorios con respecto a (Gto.). En el alineamiento de ácidos nucleicos (arriba) se observa un gap en los virus de las muestras 507 y 613 en la posición 53 y un gap en la posición 18 en la secuencia traducida (delección de arginina, R).

DNA Sequences		Translated Protein Sequences	
Species/Abbrv		*	*
1. HA_478_H3N2	C G C T C A A A A A C T T C C C G G A A A T G - - - A C A A C A		
2. HA_169_H3N2	C G C T C A A A A A C T T C C C G G A A A T G - - - A C A A C A		
3. HA_465_H3N2	C G C T C A A A A A C T T C C C G G A A A T G - - - A C A A C A		
4. HA_456_H3N2	C G C T C A A A A A C T T C C C G G A A A T G - - - A C A A C A		
5. CY122349.2_(A/swine/Mexico/Mex51/2010(H3N2))	C G C T C A A A A A C T T C C C G G A A A T G A C A A C A A C A		
6. CY122341.2_(A/swine/Mexico/Mex50/2010(H3N2))	C G C T C A A A A A C T T C C C G G A A A T G A C A A C A A C A		

DNA Sequences		Translated Protein Sequences	
Species/Abbrv		*	*
1. HA_478_H3N2	M K T I I A L S Y I L C L V F A Q K L P G N ? ? N S T A M L C L		
2. HA_169_H3N2	M K T I I A L S Y I L C L V F A Q K L P G N ? ? N S T A M L C L		
3. HA_465_H3N2	M K T I I A L S Y I L C L V F A Q K L P G N ? ? N S T A M L C L		
4. HA_456_H3N2	M K T I I A L S Y I L C L V F A Q K L P G N ? ? N S T A M L C L		
5. CY122349.2_(A/swine/Mexico/Mex51/2010(H3N2))	M K T I I A L S Y I L C L V F A Q K L P G N D N N S T A M L C L		
6. CY122341.2_(A/swine/Mexico/Mex50/2010(H3N2))	M K T I I A L S Y I L C L V F A Q K L P G N D N N S T A M L C L		

Figura 10. Mutaciones en el gen HA de los virus H3N2 aislados en patos migratorios con respecto a (Mex51). En el alineamiento de ácidos nucleicos (arriba) se observan tres gaps anidados en los cuatro virus de patos en las posiciones 60-70 y datos faltantes en los mismos en los aminoácidos en las posiciones 23 y 24 (delección de ácido aspártico, D, y asparagina, N).

BIBLIOGRAFÍA

Alexander, D. J. (2007) 'An overview of the epidemiology of avian influenza', *Vaccine*, 25(30), pp. 5637–5644. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.10.051.

Ávalos, G. P. (2008) *Determinación de la Seroprevalencia de Influenza Porcina subtipos H1N1 y H3N2 en los estados de Jalisco, Guanajuato y Michoacán*. Licenciatura. FMVZ, UNAM.

Barrón-Rodríguez *et al.* (2018) 'Isolation and characterization of influenza A virus (H6N2) from a temporary artificial pond in Mexico.', *Veterinaria México OA*, 5(2). doi: 10.21753/vmoa.5.2.475.

Beldomenico, P. M. and Uhart, M. M. (2008) 'Ecoepidemiología de los Virus de Influenza Aviar', *FAVE Sección Ciencias Veterinarias*, 7(1/2). doi: 10.14409/favecv.v7i1/2.1467.

Berlanga, H. *et al.* (2015) 'Red de Conocimientos sobre las Aves de México (AVESMX). CONABIO.' Available at: http://avesmx.conabio.gob.mx/EspeciesRegion.html#AICA_9.

Bodewes, R. and Kuiken, T. (2018) 'Changing Role of Wild Birds in the Epidemiology of Avian Influenza A Viruses', in *Advances in Virus Research*. Elsevier, pp. 279–307. doi: 10.1016/bs.aivir.2017.10.007.

Boni, M. F. *et al.* (2008) 'Homologous Recombination Is Very Rare or Absent in Human Influenza A Virus', *Journal of Virology*, 82(10), pp. 4807–4811. doi: 10.1128/JVI.02683-07.

Brown, J. D. *et al.* (2009) 'Avian influenza virus in water: Infectivity is dependent on pH, salinity and temperature', *Veterinary Microbiology*, 136(1–2), pp. 20–26. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.10.027.

Cappelle, J. *et al.* (2011) 'Characterizing the interface between wild ducks and poultry to evaluate the potential of transmission of avian pathogens', *International Journal of Health Geographics*, 10(1), p. 60. doi: 10.1186/1476-072X-10-60.

Cappelle, J. *et al.* (2014) 'Risks of Avian Influenza Transmission in Areas of Intensive Free-Ranging Duck Production with Wild Waterfowl', *EcoHealth*, 11(1), pp. 109–119. doi: 10.1007/s10393-014-0914-2.

Capua, I. and Munoz, O. (2013) 'Emergence of influenza viruses with zoonotic potential: Open issues which need to be addressed. A review', *Veterinary Microbiology*, 165(1–2), pp. 7–12. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.01.044.

Caron, A. *et al.* (2010) 'Estimating Dynamic Risk Factors for Pathogen Transmission Using Community-Level Bird Census Data at the Wildlife/Domestic Interface', *Ecology and Society*, 15(3). doi: 10.5751/ES-03547-150325.

- CDC (2012) 'First Global Estimates of 2009 H1N1 Pandemic Mortality Released by CDC-Led Collaboration'. Available at: <https://www.cdc.gov/flu/spotlights/pandemic-global-estimates.htm>.
- Chan, J. F.-W. *et al.* (2013) 'Interspecies transmission and emergence of novel viruses: lessons from bats and birds', *Trends in Microbiology*, 21(10), pp. 544–555. doi: 10.1016/j.tim.2013.05.005.
- Colón Quezada, D. (2012) *Estructura genética poblacional del pato mexicano (Anas diazi) en México*. Maestría en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México.
- CONABIO (2018) 'Listado de aves en las Ciénegas de Lerma'. CONABIO. Available at: http://avesmx.conabio.gob.mx/EspeciesRegion.html#AICA_9.
- Cuevas-Domínguez and González-Guzmán (2009) 'Detección de orthomyxovirus H7N3 en anátidos del Estado de México', *Revista electrónica de Veterinaria*, 10.
- Daszak, P., Cunningham, A. A. and Hyatt, A. D. (2001) 'Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife', *Acta Tropica*, 78(2), pp. 103–116. doi: 10.1016/S0001-706X(00)00179-0.
- Davidson, I. *et al.* (2010) 'Avian Influenza Virus H9N2 Survival at Different Temperatures and pHs', *Avian Diseases*, 54(s1), pp. 725–728. doi: 10.1637/8736-032509-ResNote.1.
- Delgadillo Álvarez, J. B. (2018a) *Informe de notificación inmediata*. REF OIE 26143. México: SENASICA. Available at: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/actualizacion-sobre-la-influenza-aviar/2018/>.
- Delgadillo Álvarez, J. B. (2018b) *Informe de seguimiento no. 1*. REF OIE 26481. México: SENASICA. Available at: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/actualizacion-sobre-la-influenza-aviar/2018/>.
- Domanska-Blicharz, K. *et al.* (2010) 'H5N1 High Pathogenicity Avian Influenza Virus Survival in Different Types of Water', *Avian Diseases*, 54(s1), pp. 734–737. doi: 10.1637/8786-040109-ResNote.1.
- Drosten, C. (2013) 'Virus ecology: a gap between detection and prediction', *Emerging Microbes & Infections*, 2(5), p. e31. doi: 10.1038/emi.2013.25.
- Dugan, V. G. *et al.* (2008) 'The Evolutionary Genetics and Emergence of Avian Influenza Viruses in Wild Birds', *PLoS Pathogens*. Edited by D. R. Perez, 4(5), p. e1000076. doi: 10.1371/journal.ppat.1000076.
- FAO (2010) 'Smallholder Poultry Production – Livelihoods, Food Security and Sociocultural Significance.' FAO Smallholder Poultry Production Paper No. 4. Rome.
- FAO (2012) 'Highly Pathogenic Avian Influenza in Mexico (H7N3) - A significant threat to poultry production not to be underestimated', *EMPRES WATCH - FAO. Emergency prevention systems*, 26.

- Freidl, G. S. *et al.* (2014) 'Influenza at the animal–human interface: a review of the literature for virological evidence of human infection with swine or avian influenza viruses other than A(H5N1)', *Eurosurveillance*, 19(18). doi: 10.2807/1560-7917.ES2014.19.18.20793.
- Fuller, T. L. *et al.* (2013) 'Predicting Hotspots for Influenza Virus Reassortment', *Emerging Infectious Diseases*, 19(4), pp. 581–588. doi: 10.3201/eid1904.120903.
- Garten, R. J. *et al.* (2009) 'Antigenic and Genetic Characteristics of Swine-Origin 2009 A(H1N1) Influenza Viruses Circulating in Humans', *Science*, 325(5937), pp. 197–201. doi: 10.1126/science.1176225.
- Godinez García, E. (2011) *Susceptibilidad de pato doméstico (Pekín) a la infección por el virus de influenza aviar H5N2 de baja patogenicidad*. Maestría en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gortazar, C. *et al.* (2014) 'Crossing the Interspecies Barrier: Opening the Door to Zoonotic Pathogens', *PLoS Pathogens*. Edited by V. Racaniello, 10(6), p. e1004129. doi: 10.1371/journal.ppat.1004129.
- Gutiérrez-Ruiz, E. J. *et al.* (2012) 'Factores sociales de la crianza de animales de traspatio en Yucatán, México', *Bioagrociencias*, 5(1), pp. 20–28.
- Harris, K. A. *et al.* (2017) 'Epidemiological Risk Factors for Animal Influenza A Viruses Overcoming Species Barriers', *EcoHealth*. doi: 10.1007/s10393-017-1244-y.
- Hatchette, T. F. (2004) 'Influenza A viruses in feral Canadian ducks: extensive reassortment in nature', *Journal of General Virology*, 85(8), pp. 2327–2337. doi: 10.1099/vir.0.79878-0.
- Hénaux, V. and Samuel, M. D. (2011) 'AVIAN INFLUENZA SHEDDING PATTERNS IN WATERFOWL: IMPLICATIONS FOR SURVEILLANCE, ENVIRONMENTAL TRANSMISSION, AND DISEASE SPREAD', *Journal of Wildlife Diseases*, 47(3), pp. 566–578. doi: 10.7589/0090-3558-47.3.566.
- Hernández-Colina, A., Yadeun, M. and García-Espinosa, G. (2017) 'Comunidad de aves acuáticas de un humedal protegido en el Estado de México, México', *Huitzil, Revista Mexicana de Ornitología*, 19(1). doi: 10.28947/hrmo.2018.19.1.310.
- Horimoto, T. *et al.* (1995) 'Origin and Molecular Changes Associated with Emergence of a Highly Pathogenic H5N2 Influenza Virus in Mexico', *Virology*, 213(1), pp. 223–230. doi: 10.1006/viro.1995.1562.
- Horimoto, T. and Kawaoka, Y. (2001) 'Pandemic Threat Posed by Avian Influenza A Viruses', *Clinical Microbiology Reviews*, 14(1), pp. 129–149. doi: 10.1128/CMR.14.1.129-149.2001.
- Hulo, C. *et al.* (2011) 'ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity', *Nucleic Acids Research*, 39(suppl_1), pp. D576–D582. doi: 10.1093/nar/gkq901.

INEGI (2007) *Censo Agrícola, Ganadero y Forestal*. Tabulados por entidad y Municipio. México.

INEGI (2016) 'Áreas geoestadísticas municipales, 2015'. México. Available at: http://www.conabio.gob.mx/informacion/metadatos/gis/muni_2015gw.xml?_httpcache=yes&_xsl=/db/metadatos/xsl/fgdc_html.xsl&_indent=no.

Ip, H. S. *et al.* (2008) 'Prevalence of Influenza A viruses in wild migratory birds in Alaska: Patterns of variation in detection at a crossroads of intercontinental flyways', *Virology Journal*, 5(1), p. 71. doi: 10.1186/1743-422X-5-71.

Kapczynski, D. R. *et al.* (2013) 'Characterization of the 2012 Highly Pathogenic Avian Influenza H7N3 Virus Isolated from Poultry in an Outbreak in Mexico: Pathobiology and Vaccine Protection', *Journal of Virology*, 87(16), pp. 9086–9096. doi: 10.1128/JVI.00666-13.

Keeler, S. P. *et al.* (2014) 'Abiotic Factors Affecting the Persistence of Avian Influenza Virus in Surface Waters of Waterfowl Habitats', *Applied and Environmental Microbiology*, 80(9), pp. 2910–2917. doi: 10.1128/AEM.03790-13.

Krauss, S. *et al.* (2004) 'Influenza A Viruses of Migrating Wild Aquatic Birds in North America', *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 4(3), pp. 177–189. doi: 10.1089/vbz.2004.4.177.

Lam, T. T.-Y. *et al.* (2013) 'The genesis and source of the H7N9 influenza viruses causing human infections in China', *Nature*, 502(7470), pp. 241–244. doi: 10.1038/nature12515.

Lara, P. F. *et al.* (2012) 'Detección de anticuerpos por IH contra los subtipos H1N1, H3N2 y H1N2 de influenza porcina (2006 - 2012) en México.', in. *AMVEC XLVII 2012*, Guadalajara, Jalisco.

Latorre-Margalef, N. *et al.* (2009) 'Effects of influenza A virus infection on migrating mallard ducks', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1659), pp. 1029–1036. doi: 10.1098/rspb.2008.1501.

Lebarbenchon, C. *et al.* (2010) 'Persistence of Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses in Natural Ecosystems', *Emerging Infectious Diseases*, 16(7), pp. 1057–1062. doi: 10.3201/eid1607.090389.

Lipatov, A. S. *et al.* (2008) 'Domestic Pigs Have Low Susceptibility to H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses', *PLoS Pathogens*. Edited by R. J. Webby, 4(7), p. e1000102. doi: 10.1371/journal.ppat.1000102.

Liu, L. *et al.* (2012) 'Comparison of Next-Generation Sequencing Systems', *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, pp. 1–11. doi: 10.1155/2012/251364.

Lloyd-Smith, J. O. *et al.* (2009) 'Epidemic Dynamics at the Human-Animal Interface', *Science*, 326(5958), pp. 1362–1367. doi: 10.1126/science.1177345.

- López-Robles, G. *et al.* (2014) 'Serological and molecular prevalence of swine influenza virus on farms in northwestern Mexico', *Veterinary Microbiology*, 172(1–2), pp. 323–328. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.05.017.
- Lu, L., Lycett, S. J. and Leigh Brown, A. J. (2014) 'Determining the Phylogenetic and Phylogeographic Origin of Highly Pathogenic Avian Influenza (H7N3) in Mexico', *PLoS ONE*. Edited by F. Krammer, 9(9), p. e107330. doi: 10.1371/journal.pone.0107330.
- Ma, M.-J. *et al.* (2014) 'Comparison of commercial influenza A virus assays in detecting avian influenza H7N9 among poultry cloacal swabs, China', *Journal of Clinical Virology*, 59(4), pp. 242–245. doi: 10.1016/j.jcv.2014.01.009.
- Martínez Bautista, N. R. (2018) *Identificación y caracterización de variantes endémicas del virus de PRRS en granjas porcinas de México*. Doctorado en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Montalvo-Corral, M. and Hernández, J. (2010) 'Genetic analysis of avian influenza virus from migratory waterfowl in Mexico', *Archives of Virology*, 155(1), pp. 97–101. doi: 10.1007/s00705-009-0554-y.
- Montalvo-Corral, M., López-Robles, G. and Hernández, J. (2011) 'Avian Influenza Survey in Migrating Waterfowl in Sonora, Mexico: Avian Influenza Survey in Mexico', *Transboundary and Emerging Diseases*, 58(1), pp. 63–68. doi: 10.1111/j.1865-1682.2010.01182.x.
- Munoz, O. *et al.* (2016) 'Genetic Adaptation of Influenza A Viruses in Domestic Animals and Their Potential Role in Interspecies Transmission: A Literature Review', *EcoHealth*, 13(1), pp. 171–198. doi: 10.1007/s10393-014-1004-1.
- Munster, V. J. *et al.* (2007) 'Spatial, Temporal, and Species Variation in Prevalence of Influenza A Viruses in Wild Migratory Birds', *PLoS Pathogens*, 3(5), p. e61. doi: 10.1371/journal.ppat.0030061.
- Munster, V. J. and Fouchier, R. A. M. (2009) 'Avian influenza virus: Of virus and bird ecology', *Vaccine*, 27(45), pp. 6340–6344. doi: 10.1016/j.vaccine.2009.02.082.
- Murray, K. A. and Daszak, P. (2013) 'Human ecology in pathogenic landscapes: two hypotheses on how land use change drives viral emergence', *Current Opinion in Virology*, 3(1), pp. 79–83. doi: 10.1016/j.coviro.2013.01.006.
- Obregón-Ascencio, A. E. (2011) *Condiciones hidrológicas in situ de un bordo con aves acuáticas migratorias durante el aislamiento del virus de influenza tipo A*. Maestría en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Ochoa Vallejo, D. (2010) *Prevalencia de factores de riesgo para infección por virus de influenza aviar en personas dedicadas a cinegética en Lerma, Estado de México*. Maestría en Medicina Veterinaria. Universidad Nacional Autónoma de México.

OIE (2016a) *Informe de seguimiento n°1 (Informe final)*. Notificaciones inmediatas e informes de seguimiento de influenza aviar altamente patógena (tipos H5 y H7) 1. México: Organización Mundial de Sanidad Animal, OIE. Available at: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/actualizacion-sobre-la-influenza-aviar/2016/>.

OIE (2016b) *Informe de seguimiento n°7*. Notificaciones inmediatas e informes de seguimiento de influenza aviar altamente patógena (tipos H5 y H7) 7. México: Organización Mundial de Sanidad Animal, OIE. Available at: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/actualizacion-sobre-la-influenza-aviar/2016/>.

OIE (2018) 'Actualización sobre la influenza aviar en animales (tipos H5 y H7)'. Organización Mundial de Sanidad Animal. Available at: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/actualizacion-sobre-la-influenza-aviar/2016/>.

Olsen, B. *et al.* (2006a) 'Global Patterns of Influenza A Virus in Wild Birds', *Science*, 312(5772), pp. 384–388. doi: 10.1126/science.1122438.

Olsen, B. *et al.* (2006b) 'Global Patterns of Influenza A Virus in Wild Birds', *Science*, 312(5772), pp. 384–388. doi: 10.1126/science.1122438.

Olsen, C. W., Karasin, A. and Erickson, G. (2003) 'Characterization of a swine-like reassortant H1N2 influenza virus isolated from a wild duck in the United States', *Virus Research*, 93(1), pp. 115–121. doi: 10.1016/S0168-1702(03)00073-X.

Ornelas-Eusebio, E. *et al.* (2015) 'Molecular characterization of an influenza A virus (H4N2) isolated from waterfowl habitats in the State of Mexico', *Journal of Veterinary Medical Science*, 77(3), pp. 365–369. doi: 10.1292/jvms.14-0267.

Pérez Rivera, C. M. (2010) *Determinación de la seroprevalencia e identificación por RT-PCR de los subtipos virales de influenza porcina en cerdos de trapatio de la comunidad de La Gloria, Veracruz*. Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

Pompei, S., Loreto, V. and Tria, F. (2012) 'Phylogenetic Properties of RNA Viruses', *PLoS ONE*. Edited by Y. Moreno, 7(9), p. e44849. doi: 10.1371/journal.pone.0044849.

RAMSAR (2004) 'Home Ramsar Sites Information Service'. Available at: <https://rsis.ramsar.org/ris/1335>.

Rose, K. *et al.* (2006) *Wild bird highly pathogenic avian influenza surveillance: sample collection from healthy, sick and dead birds*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO animal production and health manual, 4).

Saavedra-Montañez, M. *et al.* (2013) 'Retrospective serological survey of influenza viruses in backyard pigs from Mexico City', *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 7(5), pp. 827–832. doi: 10.1111/irv.12063.

Saavedra-Montañez, M. *et al.* (2018) 'Identification and genomic characterization of influenza viruses with different origin in Mexican pigs', *Transboundary and Emerging Diseases*. doi: 10.1111/tbed.12998.

SAGARPA (2011) 'ACUERDO por el que se da a conocer la campaña y las medidas zoonosanitarias que deberán aplicarse para el diagnóstico, prevención, control y erradicación de la Influenza Aviar Notificable, en las zonas del territorio de los Estados Unidos Mexicanos en las que se encuentre presente esa enfermedad.' SECRETARIA DE AGRICULTURA, GANADERIA, DESARROLLO RURAL, PESCA Y ALIMENTACION SAGARPA. Available at: <https://www.gob.mx/senasica/documentos/acuerdo-por-el-que-se-da-a-conocer-la-campana-y-las-medidas-zoonosanitarias-que-deberan-aplicarse-para-el-diagnostico-prevencion-control-y-erradicacion-de-la-influenza-aviar-notificable>.

Salazar, M. I. *et al.* (2009) 'Variación genética y antigénica de los virus de influenza A'. Dirección de Fomento Editorial.

Sánchez-Betancourt, J. I. *et al.* (2017) 'Complete genome sequence of a novel influenza A H1N2 virus circulating in swine from Central Bajío region, Mexico', *Transboundary and Emerging Diseases*. doi: 10.1111/tbed.12620.

SEMARNAT (2002) 'DECRETO por el que se declara área natural protegida, con el carácter de área de protección de flora y fauna, la región conocida como Ciénegas del Lerma, ubicada en los municipios de Lerma, Santiago Tianguistenco, Almoloya del Río, Calpulhuac, San Mateo Atenco, Metepec y Texcalyacac en el Estado de México, con una superficie total de 3,023-95-74.005 hectáreas.' Available at: www.conanp.gob.mx/sig/decretos/apff/Cienegaslerma.pdf.

SEMARNAT (2018) 'ACUERDO por el que se da a conocer el resumen del Programa de Manejo del Área Natural Protegida con categoría de Área de Protección de Flora y Fauna la zona conocida como Ciénegas del Lerma.' Diario Oficial de la Federación.

Senne, D. A. *et al.* (1996) 'Survey of the Hemagglutinin (HA) Cleavage Site Sequence of H5 and H7 Avian Influenza Viruses: Amino Acid Sequence at the HA Cleavage Site as a Marker of Pathogenicity Potential', *Avian Diseases*, 40(2), p. 425. doi: 10.2307/1592241.

de Silva, U. C. *et al.* (2012) 'A comprehensive analysis of reassortment in influenza A virus', *Biology Open*, 1(4), pp. 385–390. doi: 10.1242/bio.2012281.

Simms, L. and Jeggo, M. (2014a) 'Avian Influenza from an Ecohealth Perspective', *EcoHealth*, 11(1), pp. 4–14. doi: 10.1007/s10393-014-0927-x.

Simms, L. and Jeggo, M. (2014b) 'Avian Influenza from an Ecohealth Perspective', *EcoHealth*, 11(1), pp. 4–14. doi: 10.1007/s10393-014-0927-x.

Smith, G. J. D. *et al.* (2009a) 'Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic', *Nature*, 459(7250), pp. 1122–1125. doi: 10.1038/nature08182.

Smith, G. J. D. *et al.* (2009b) 'Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic', *Nature*, 459(7250), pp. 1122–1125. doi: 10.1038/nature08182.

- Soriano García, L. D. (2009) *Monitoreo de influenza aviar en aves silvestres en humedales de la República Mexicana*. Maestría en Ciencias en Biomedicina y Biotecnología Molecular. Instituto Politécnico Nacional.
- Spackman, E. *et al.* (2005) 'Phylogenetic analyses of type A influenza genes in natural reservoir species in North America reveals genetic variation', *Virus Research*, 114(1–2), pp. 89–100. doi: 10.1016/j.virusres.2005.05.013.
- Spackman, E. (2009) 'The ecology of avian influenza virus in wild birds: What does this mean for poultry?', *Poultry Science*, 88(4), pp. 847–850. doi: 10.3382/ps.2008-00336.
- Spackman, E. (ed.) (2014) *Animal Influenza Virus*. New York, NY: Springer New York (Methods in Molecular Biology). doi: 10.1007/978-1-4939-0758-8.
- Stallknecht *et al.* (1990) 'Effects of pH, Temperature, and Salinity on Persistence of Avian Influenza Viruses in Water', *Avian diseases*, 34, pp. 412–8.
- Stallknecht, D. E. *et al.* (1990) 'Avian Influenza Viruses from Migratory and Resident Ducks of Coastal Louisiana', *Avian Diseases*, 34(2), p. 398. doi: 10.2307/1591427.
- Steffani-Hernández, G. *et al.* (2016) 'Genomic analysis of an atypical Mexican low-pathogenic H5N2 avian influenza virus', *Veterinaria México OA*, 3(2). doi: 10.21753/vmoa.3.2.363.
- Suzuki, Y. (2006) 'Natural Selection on the Influenza Virus Genome', *Molecular Biology and Evolution*, 23(10), pp. 1902–1911. doi: 10.1093/molbev/msl050.
- Tafurt, Y. and Marin, M. (2014) 'Principales mecanismos de reparación de daños en la molécula de ADN', *Revista Biosalud*, 13(2), pp. 95–110.
- Timofeeva, T. A. *et al.* (2017) 'Predicting the Evolutionary Variability of the Influenza A Virus', *Acta Naturae*, 9(3), pp. 48–54.
- Tong, S. *et al.* (2013) 'New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses', *PLoS Pathogens*. Edited by K. Subbarao, 9(10), p. e1003657. doi: 10.1371/journal.ppat.1003657.
- Van Borm, S. *et al.* (2012) 'Phylogeographic analysis of avian influenza viruses isolated from Charadriiformes in Belgium confirms intercontinental reassortment in gulls', *Archives of Virology*, 157(8), pp. 1509–1522. doi: 10.1007/s00705-012-1323-x.
- Vandegrift, K. J. *et al.* (2010) 'Ecology of avian influenza viruses in a changing world: Ecology of avian influenza viruses in a changing world', *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1195(1), pp. 113–128. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05451.x.
- Verhagen, J. *et al.* (2015) 'Wild bird surveillance around outbreaks of highly pathogenic avian influenza A(H5N8) virus in the Netherlands, 2014, within the context of global flyways', *Eurosurveillance*, 20(12), p. 21069. doi: 10.2807/1560-7917.ES2015.20.12.21069.

Verhagen, J. H. *et al.* (2017) 'Discordant detection of avian influenza virus subtypes in time and space between poultry and wild birds; Towards improvement of surveillance programs', *PLOS ONE*. Edited by M. Lierz, 12(3), p. e0173470. doi: 10.1371/journal.pone.0173470.

Verhagen, J. H., Fouchier, R. A. M. and Kuiken, T. (2016) *Influenza A virus in migratory birds: Ecology, evaluation and the wild-domestic interface = Griepvirussen in trekvogels: ecologie, evolutie en de koppeling tussen wilde en gedomesticeerde gastheren*. Erasmus University Rotterdam.

Wainwright, S. and Trevennec, C. (2012) 'Highly Pathogenic Avian Influenza in Mexico (H7N3) - A significant threat to poultry production not to be underestimated', *FAO-EMPRES*. Available at: <http://www.fao.org/docrep/016/an395e/an395e.pdf>.

Webster, R. G. *et al.* (1992) 'Evolution and Ecology of Influenza A Viruses', *Microbiological Reviews*, 56.

Wohl, S., Schaffner, S. F. and Sabeti, P. C. (2016) 'Genomic Analysis of Viral Outbreaks', *Annual Review of Virology*, 3(1), pp. 173–195. doi: 10.1146/annurev-virology-110615-035747.

Wu, Ying *et al.* (2014) 'Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11', *Trends in Microbiology*, 22(4), pp. 183–191. doi: 10.1016/j.tim.2014.01.010.

Yassine, H. M., Lee, C.-W. and Saif, Y. M. (2011) 'Interspecies Transmission of Influenza A Viruses Between Swine and Poultry', in Richt, J. A. and Webby, R. J. (eds) *Swine Influenza*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 227–240. doi: 10.1007/82_2011_180.