



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

DETERMINACIÓN DE VIRUS DE INFLUENZA A EN CERDOS ASILVESTRADOS
DE LA REGIÓN DE LAGUNA DE TÉMINOS, CAMPECHE, MÉXICO

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

PRESENTA:
BRENDA ALINE MAYA BADILLO

TUTOR PRINCIPAL:
JOSÉ IVÁN SÁNCHEZ BETANCOURT
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

COMITÉ TUTOR:
RAFAEL OJEDA FLORES
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

ANDREA CHAVES RAMÍREZ
UNIVERSIDAD DE DAVIS, CALIFORNIA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

MARZO, 2020



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.

DEDICATORIA

“Los animales del mundo existen por una propia razón. No fueron hechos para los humanos.”

Alice Walker

A mi amada familia. Gracias por todo el amor y apoyo incondicional. Mamá, papá, *Lulú* y *Francisco*, son los mejores padres que la vida pudo darme, siempre se los he dicho y se los seguiré diciendo, no hay palabras para describir cuanto los amo y admiro, son un ejemplo de vida y mis triunfos no podrían existir si ustedes no estuvieran conmigo en todo momento, siempre tan cerca a pesar de la distancia. Mis hermanas loquitas, *Sandy* y *Diana* que siempre serán parte de mi vida, mi amor por ustedes es infinito, gracias por siempre motivarme y a pesar de no entender todo lo que hago, siempre se muestran interesadas por saber todo acerca de esta profesión que amo tanto. A mi tía hermosa, *Paty*, eres mi segunda mamá, gracias por apoyarme en todo momento, a tu manera y siempre con ese sentido del humor, tan divertido y sincero. A mis sobrinos, *Hanna*, *Khloé* y *Kayden*, aunque no entiendan mucho de lo que hace su tía, deben de saber que los amo y que son parte fundamental de mi vida. Por último, *Vale*, mi hermano político, al que siempre le ha interesado todo lo que hacemos y se siente muy orgulloso de mis logros, sabes que yo siento lo mismo por ti. Me alegra tenerlos en mi vida.

A mi novio Memo. Gracias por estar, por ser mi compañero de vida, por apoyarme a pesar de no siempre estar de acuerdo con mis locuras. Esta etapa de mi vida no habría sido lo mismo sin ti. Seguimos creciendo y avanzando juntos, pero también de forma independiente, ese sinergismo me encanta de nuestra relación, a veces alocada, a veces tranquila, pero siempre con el apoyo el uno del otro. Te amo y sé que aún vienen más aventuras por vivir juntos, *Ludi mi amor*.

A mi más grande amor perruno, mi Spaiky. Sé que nunca entenderías cuanto te amo y lo agradecida que estoy contigo por toda la alegría que me provoca tu existencia. Siempre serás una inspiración para mi en todo sentido.

A mis amigos que se han vuelto mi familia. A todos mis amigos que saben cuanto los quiero y que no terminaría de poner sus nombres, pero en especial a *Karen Marina* (*K*, mi hermana) y a *Robert*, por ser parte de esta aventura, por los sábados de barbacoa, por las risas, por la política y mil cosas más que no terminaría de escribir, los amísimo.

AGRADECIMIENTOS

Dr. José Iván Sánchez Betancourt gracias por todo. Desde el momento en el que me aceptó como su alumna de Servicio Social he recibido siempre y en todo momento su apoyo, sus enseñanzas, la mejor disponibilidad para ayudarme a resolver dudas, escucharme, aceptar mis ideas y ocurrencias, ha sido un excelente guía y amigo. Lo admiro, respeto, quiero y estoy muy contenta de encontrarlo en mi camino de formación académica y de vida, este proyecto de maestría no se habría podido lograr sin su ayuda y sin su confianza en mí.

Dr. Rafel Ojeda Flores gracias por todo. La conexión para que te volvieras uno de mis tutores fue toda una coincidencia, la cual agradezco bastante porque siempre he tenido tu apoyo, disposición y amabilidad para ayudarme, para resolver dudas, para escucharme, para integrarme y recibirme en tu equipo de trabajo. Siempre me has parecido una persona muy brillante a la cual admiro mucho, estoy muy contenta que participaras en mi formación académica en esta etapa de vida y en este proyecto.

Dra. Andrea Chaves Ramírez gracias por todo. Conocerme y que aceptaras ser una de mis tutoras definitivamente es el mejor ejemplo de que la vida te tiene sorpresas inesperadas y muy bellas. Trabajar contigo fue todo un placer y logro para mí porque te admiro mucho. Te agradezco aún más por el apoyo incondicional, la disponibilidad y la confianza que tuviste en tu primera alumna mexicana de maestría. Tenerme como tutora y guía en esta etapa de vida y en este proyecto fue maravilloso. “Pura vida”.

Saúl Reveles Félix gracias por una de las mejores aventuras. Tú sabes el cariño que te tengo y de verdad que el trabajo de campo no habría sido lo mismo sin ti y sin tu carisma. Tu apoyo siempre ha sido incondicional y este proyecto es el resultado de amistad y colaboración en equipo. “Domador de rusos” tu alegría, disponibilidad, apoyo y confianza hacia mí es una de las cosas que más valoro de nuestra amistad y trabajo en conjunto.

Guillermo Orta Pineda gracias por ser mi compañero de vida. Te amo y me alegra tanto avanzar de manera independiente pero también en conjunto. Me siento contenta y orgullosa de lo que tenemos y de lo que seguimos construyendo. Tu apoyo en campo

fue de gran ayuda para el desarrollo de este proyecto de maestría, la aventura en Laguna de Términos siempre estará en mis recuerdos de felicidad y plenitud.

Ing. José Carballo gracias por el apoyo logístico para el trabajo de campo, por la disponibilidad y confianza al permitirnos entrar al Área de Protección de Flora y Fauna Laguna de Términos (APFFLT), al compartir información para un mejor desarrollo del proyecto, así como coordinar a su equipo de trabajo para que nos apoyaran en todo momento, en este sentido gracias a todo el personal de la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP) de Palizada, Campeche por su ayuda y trabajo.

Ing. Roberto Calzada gracias por todo tu apoyo durante la estancia en Campeche, el recibimos es algo que siempre valoraremos, por hacernos sentir como en casa, por permitirnos conocer a tu mamá linda y a tu equipo de trabajo que nos integraron con mucha calidez y cariño a su familia, este cariño es recíproco.

Dr. Mauro Sanvicente gracias por el apoyo inicial para comenzar con este proyecto en la fase de trabajo de campo, por tus consejos y disponibilidad en el trabajo colaborativo.

M.C. Carmen Gaitán, M.C. María José Martínez Mercado y Dr. Manuel Saavedra gracias por todo el apoyo y conocimiento que me han brindado, desde técnicas serológicas hasta secuenciación y análisis filogenéticos. Siempre han estado con la mejor disponibilidad y actitud para resolver mis dudas y ayudarme en todas las etapas académicas que he vivido con ustedes.

Dr. Noé Orlando Juárez gracias por tu asesoría en el análisis de los datos. El conocimiento, paciencia y ayuda brindada de tu parte fue de gran relevancia para la conclusión de este trabajo. Eres un excelente y amable guía.

Dr. Carlos Zambrana Torrelio gracias por aceptarme en EcoHealth Alliance, para mi fue todo un placer conocerlo y aprender de una persona tan brillante como usted. Siempre estaré muy agradecida por la oportunidad que me brindó porque en definitiva ha sido una experiencia inolvidable. También le agradezco a su equipo de trabajo, pero en especial a **Samantha Maher, Sonia Dattaray y Evelyn Luciano** por ser tan pacientes y amables conmigo.

Al Grupo de Investigación del Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos.
Gracias a todos los que forman parte del grupo de investigación, pero en especial a **Alef**

González y Mariana Pérez por su apoyo técnico en la etapa del trabajo de campo.

A la Unidad de Investigación de la FMVZ. Gracias por el apoyo brindado para el desarrollo de la fase de laboratorio de este proyecto, en especial al **Dr. René Álvaro Segura Velázquez** por su disponibilidad y ayuda.

Al Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos. Gracias a todo el personal del departamento, pero en especial al **Jefe de Departamento Gerardo Ramírez** por la disposición y amabilidad para brindarme apoyo durante el trabajo de laboratorio, así como al **Sr. Inocente Lara** siempre dispuesto ayudarme o a resolverme cualquier duda.

Al Laboratorio de Ecología de Enfermedades y Una Salud. Gracias a todos los que forman parte de este Grupo de Investigación, he aprendido bastante de muchos de ustedes, gracias por la integración y los seminarios con retroalimentación para mejorar cada día.

A los miembros de mi jurado, Dr. Humberto Ramírez, Dr. Hélio Zarza y Dr. Salvador Fonseca. Gracias por todas sus observaciones, correcciones y consejos para que este proyecto se concluyera de la mejor manera.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Gracias por la beca nacional brindada durante la duración de la Maestría y por la beca mixta para el desarrollo de la Estancia de Investigación.

A la FMVZ de la UNAM. Por ser la sede donde desarrolle gran parte de mis estudios de Maestría y por ser siempre mi amada casa de estudios.

Al proyecto “**Desarrollo de una RT-PCR múltiple para el diagnóstico de diarrea epidémica porcina (DEP), gastroenteritis transmisible (GET) y rotavirus porcino (RVP)**” el cual estuvo financiado por la **Asociación IPVS México 2014 A. C.**, a cargo del M.C. Saúl Reveles Félix.

Al proyecto “**Estudio eco-epidemiológico del virus de influenza A en la interfaz entre animales silvestres, domésticos y sinantrópicos, bajo un gradiente de perturbación antropogénica en la región de Laguna de Términos, Campeche**” el cual estuvo financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (**PAPIIT**), con número de proyecto **IN224820**, a cargo del Dr. José Iván Sánchez Betancourt.

RESUMEN

El crecimiento acelerado de la población humana ha generado la transformación de los ecosistemas naturales en paisajes antrópicos. Esto ha favorecido la presencia de especies invasoras que facilitan la introducción, transmisión y propagación de enfermedades, principalmente en ecosistemas tropicales. Por sus características ecológicas y evolutivas las enfermedades virales asociadas a los cerdos asilvestrados han adquirido mayor relevancia, ya que debido al comportamiento sinantrópico del cerdo asilvestrado se han establecido nuevas interacciones biológicas, por ejemplo, con los virus de influenza. En México existen pocos estudios sobre la interacción de virus de influenza A con cerdos asilvestrados. En este estudio se buscó demostrar la participación del cerdo asilvestrado en la transmisión y el mantenimiento de virus de influenza A en una región del sureste mexicano. Entre mayo y octubre de 2018 fueron tomadas muestras de suero, hisopos nasales y órganos de 61 cerdos asilvestrados en la región de Laguna de Términos, Campeche para serología y detección molecular. Se aisló el virus de las muestras positivas en embriones de pollo y se secuenció el genoma completo del virus de influenza A. Se hizo un análisis filogenético y por medio de análisis de percepción remota se determinó el grado de antropización de las áreas de estudio a través del cálculo del Índice Integrado Relativo de Antropización. Los datos se analizaron bajo un modelo de regresión logística. Se detectaron anticuerpos contra subtipos de influenza H1N1 humano (11.47%), H1N1 porcino (8.19%) y H5N2 aviar (1.63%). La prevalencia molecular fue del 19.67%. Se obtuvo la secuencia de un subtipo H5N2 que se agrupó con secuencias reportadas en cerdos y aves de México. Se encontró un efecto positivo de la antropización del paisaje sobre la seropositividad, además las variables edad y prevalencia resultaron dependientes, los animales positivos molecularmente en su mayoría fueron adultos. La exposición de los cerdos asilvestrados a virus humanos confirma la interacción entre estos hospederos y el virus y sugiere la existencia de antroponosis. El ámbito hogareño les permite distribirse en grandes áreas y favorece la interacción con diversos hospederos y fuentes de infección. Los ecosistemas con mayor transformación antropogénica favorecen la presencia del cerdo asilvestrado y permiten su participación en la transmisión y mantenimiento de virus de influenza A en la región de Laguna de Términos.

Palabras clave: antroponosis, eco-epidemiología, H5N2, seroprevalencia, sinantrópico.

ABSTRACT

The accelerated growth of human population has generated the transformation of natural ecosystems into anthropic landscapes. This has favored the presence of invasive species that facilitate the introduction, transmission and spread of diseases, mainly in tropical ecosystems. Due to their ecological and evolutionary characteristics, viral diseases associated with feral pigs have become more relevant, since due to the synanthropic behavior of feral pigs, new biological interactions have been established, for example, with influenza viruses. In Mexico there are few studies on the interaction of influenza A virus with feral pigs. This study sought to demonstrate the participation of feral pigs in the transmission and maintenance of influenza A virus in a region of southeastern Mexico. Between May and October 2018, serum samples, nasal swabs and organs from 61 feral pigs were obtained at the Laguna de Términos region, Campeche for serology and molecular detection. The virus was isolated from the positive samples in chicken embryos and the complete genome of influenza A virus was sequenced. A phylogenetic analysis was made and by means of remote perception analysis the degree of anthropization of the study areas was determined through of the calculation of the Integrated Relative Anthropization Index. Data were analyzed under a logistic regression model. Antibodies against human H1N1 influenza subtypes (11.47%), porcine H1N1 (8.19%) and avian H5N2 (1.63%) were detected. The molecular prevalence was 19.67%. The sequence of a subtype H5N2 was obtained that was grouped with sequences reported in pigs and birds of Mexico. A positive effect of landscape anthropization on seropositivity was found; in addition, the age and prevalence variables were found to be dependent, molecularly positive, and the animals were mostly adults. Exposure of pigs feral to human viruses confirms the interaction between these hosts and the virus, and suggests the existence of anthroponosis. The home environment allows them to be distributed in large areas and favors the interaction with various hosts and sources of infection. Ecosystems with greater anthropogenic transformation facilitate the presence of feral pigs and allow their participation in the transmission and maintenance of influenza A virus at the Laguna de Terms region.

Keywords: anthroponosis, eco-epidemiology, H5N2, seroprevalence, synanthropic.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
IMPACTO DE LAS ACTIVIDADES ANTROPOGÉNICAS EN PROCESOS ECOLÓGICOS	1
ESPECIES EXÓTICAS INVASORAS	4
EL CERDO ASILVESTRAO (<i>Sus scrofa</i>) COMO ESPECIE EXÓTICA INVASORA	7
Origen y distribución	7
Rasgos de historia de vida	11
El cerdo asilvestrado en la interfaz entre animales silvestres, domésticos y seres humanos	13
VIRUS DE INFLUENZA A	14
Características ecológicas y evolutivas	16
CERDO ASILVESTRAO Y VIRUS DE INFLUENZA A: SITUACIÓN EN MÉXICO	20
JUSTIFICACIÓN	22
HIPÓTESIS	23
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS PARTICULARES	24
MATERIALES Y MÉTODO	25
<i>Área de estudio</i>	25
<i>Categorización de los animales muestreados</i>	26
<i>Toma de muestras, transporte y almacenamiento</i>	27
<i>Inhibición de la hemoaglutinación (IH)</i>	28
<i>Extracción del RNA viral</i>	31
<i>qRT-PCR del gen M del virus de influenza A</i>	31
<i>Aislamiento viral</i>	33
<i>Secuenciación</i>	35
<i>Análisis filogenéticos</i>	36
<i>Caracterización del grado de antropización del paisaje</i>	36
<i>Análisis de datos</i>	38
RESULTADOS	41
<i>Categorización de los animales muestreados</i>	41

<i>Inhibición de la hemoaglutinación</i>	42
<i>qRT-PCR del gen M del virus de influenza A</i>	44
<i>Aislamiento viral</i>	46
<i>Secuenciación y análisis filogenéticos</i>	46
<i>Caracterización del grado de antropización del paisaje</i>	51
<i>Análisis de datos</i>	54
• <i>Áreas de amortiguamiento</i>	54
• <i>Análisis estadístico</i>	57
- <i>Modelo de regresión logística</i>	57
- <i>Ji cuadrada (χ^2)</i>	58
DISCUSIÓN	59
CONCLUSIONES	72
RECOMENDACIONES	74
REFERENCIAS	75
ANEXOS	92

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Resumen de siete medidas corporales externas de cerdos asilvestrados	12
Cuadro 2. Genes y proteínas de virus de influenza A.....	16
Cuadro 3. Componentes y volúmenes de kit para la qRT-PCR.....	32
Cuadro 4. Condiciones de amplificación de la qRT-PCR	32
Cuadro 5. Valor de antropización por tipo de cobertura.....	38
Cuadro 6. Resultados de los cerdos asilvestrados positivos a la serología.....	43
Cuadro 7. Resultados de los cerdos asilvestrados positivos a la qRT-PCR	45
Cuadro 8. Valores del INRA.....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Composición taxonómica de los cerdos asilvestrados.....	8
Figura 2. Puntos de domesticación del cerdo y distribución nativa del jabalí.	9
Figura 3. Distribución mundial de <i>Sus scrofa</i>	10
Figura 4. Virus de influenza A.....	15
Figura 5. Hospederos del virus de influenza por especies	17
Figura 6. Virus de influenza A.....	19
Figura 7. Área de estudio y sitios de muestreo	26
Figura 8. Grupo A y Grupo B de cerdos asilvestrados	41
Figura 9. Grupo 1 y Grupo 2 de cerdos asilvestrados.....	42
Figura 10. Gráfica de la qRT-PCR.....	45
Figura 11. Árbol filogenético del gen HA del virus de influenza H5N2	49
Figura 12. Árbol filogenético del gen NA del virus de influenza H5N2	50
Figura 13. Proporción de coberturas en general	52
Figura 14. Proporción de coberturas por cuadrante	52
Figura 15. Área de estudio y unidades de análisis (UA).....	53
Figura 16. Sitios de muestreo con áreas de amortiguamiento para hembras y machos	55
Figura 17. Sitios de muestreo con áreas de amortiguamiento de machos positivos	56
Figura 18. Sitios de muestreo con áreas de amortiguamiento de hembras positivas	57
Figura 19. Modelo de regresión logística.....	58

ABREVIATURAS Y SIGLAS

AC	Altura a la Cruz
ANP	Área Natural Protegida
APFFLT	Área de Protección de Flora y Fauna Laguna de Términos
BLAST	Del inglés "Basic Local Alignment Tool"
°C	Grados Celsius
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CONABIO	Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad
CONACYT	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
CONANP	Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas
Ct	Ciclo umbral
CTR	Circunferencia del tórax
DOF	Diario Oficial de la Federación
DNA	Ácido Desoxirribonucleico del inglés "Deoxyribonucleic Acid"
DMZC	Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos
DRIFT	Deriva genética, del inglés "Antigenic drift"
EE. UU.	Estados Unidos de América
EP	Embrión de pollo
FMVZ	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
HA	Hemoaglutinina
IH	Inhibición de la Hemoaglutinación
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
INRA	Índice Integrado Relativo de Antropización
km	Kilómetro
km²	Kilómetro
LH	Largo de rostro ("hocico")
LO	Largo de oreja
LT	Largo total
M	Proteína de Matriz

M1	Proteína de Matriz 1
M2	Proteína de Matriz 2 o canal de iones
µl	Microlitros
NA	Neuraminidasa
NCBI	nacional Center for Biotechnology Information
NP	Nucleoproteína
NS	Proteína no estructural
NTC	Control sin templado
PA	Polimerasa
pb	Pares de bases
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos
PB1	Polimerasa Básica 1
PB2	Polimerasa Básica 2
PGM	Sistema Ion Torrent Genome Machine
RNA	Ácido Ribonucleico del inglés "Ribonucleic Acid"
qRT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real
rpm	Revoluciones por minuto
Saa2,3-GAL	Receptores de ácido siálico α2,3 - Galactosa
Saa2,6-GAL	Receptores de ácido siálico α2,6 - Galactosa
SENTINEL	Imágenes satelitales del satélite SENTINEL-2a
SHIFT	Reordenamiento genético
SICUA	Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales
SPF	Libre de Patógenos Específicos
SUA	Subunidades de Análisis
UA	Unidades de Análisis
UHA	Unidades Hemoaglutinantes
UICN	Unidad Mundial para la Naturaleza
UI-FMVZ	Unidad de Investigación de la FMVZ-UNAM
WHO	Organización Mundial de la Salud "OMS"

INTRODUCCIÓN

IMPACTO DE LAS ACTIVIDADES ANTROPOGÉNICAS EN PROCESOS ECOLÓGICOS

En la actualidad se está viviendo una de las eras más devastadoras para la vida en la Tierra, el Antropoceno, del griego *Anthropos* (ser humano) y *kainos* (nuevo), propuesta como una nueva era geológica (Corlett, 2015; Crutzen, 2002) la cual enfrenta un triple desafío a causa de las actividades humanas, las tasas actuales de cambio climático introducido por el ser humano, la extinción masiva de especies locales y globales y el uso inadecuado de la tierra (Kremen y Merenlender, 2018).

Entre el manejo inadecuado de la tierra y otros cambios de uso de suelo, la conversión de los ecosistemas naturales a tierras de trabajo agrícolas y ganaderas representa la mayor amenaza para el mantenimiento de la biodiversidad (Newbold *et al.*, 2015). Durante el último siglo, esta conversión de uso de suelo ha sido particularmente drástica en los trópicos (Song *et al.*, 2018).

Los bosques tropicales albergan aproximadamente el 70% de la biodiversidad a nivel mundial. Sin embargo, se estima que en la región tropical se pierden aproximadamente 15 millones de hectáreas de bosque maduro por año, de las cuales el 60% es debido a la fragmentación del hábitat asociada a las actividades agropecuarias, forestales, así como pastoreo mal organizado, la urbanización, la minería, la tala furtiva e incendios (Cristóbal *et al.*, 2014; Dirzo, Aguirre y López, 2009).

Las actividades agropecuarias, afectan directa e intensamente procesos ecológicos en los diferentes niveles de organización, que van desde el comportamiento de los individuos, la

dinámica de las poblaciones, la composición y estructura de las comunidades, los flujos de materia y energía y la dinámica de enfermedades (Dale y Polasky, 2007; Trilleras, Jaramillo, Vega y Balvanera, 2015), favoreciendo de esta manera, el surgimiento de enfermedades infecciosas (principalmente zoonóticas) y eventos de emergencia, así como la modificación de la transmisión de enfermedades endémicas (Patz *et al.*, 2004).

De tal manera que dentro de los factores asociados a la propagación e incremento de eventos zoonóticos se encuentran el cambio climático, el comercio, el turismo, la fragmentación y deforestación de los bosques tropicales (Allan y Ostfeld, 2003; Suzán *et al.*, 2008). Por ello la ecoepidemiología general de las zoonosis se sustenta en la relación que existe entre animales domésticos, silvestres o sinantrópicos que son reservorios de diferentes agentes infecciosos y las poblaciones humanas (WHO, 2006).

La transmisión de enfermedades zoonóticas puede darse por contacto directo, indirecto y a través de vectores (Reyes-Novelo *et al.*, 2011). Principalmente, se presenta en dos tipos de ambiente, en el ambiente sinantrópico, considerado como el ambiente doméstico y peridoméstico del ser humano que puede incluir sitios rurales, suburbanos y urbanos y el segundo es el ambiente exoantrópico, localizado fuera del alcance de la población humana, donde la estructura de la vegetación permanece sin alteración con bajos niveles de fragmentación y perturbación, así como una gran capacidad de resiliencia (Hubálek, 2003; Reyes-Novelo *et al.*, 2011). De manera adicional se encuentra un tercer tipo de ambiente determinado como ecotono o zona de transición, que se define como un sistema dinámico que compone los límites entre dos sistemas ecológicos adyacentes. En esta zona de transición existen diferentes ambientes por lo que juega un papel importante en los ciclos de transmisión de enfermedades zoonóticas (Despommier, Ellis y Wilcox, 2006).

Al entender como los hospederos utilizan los recursos brindados por el ambiente y su repercusión en las interacciones entre especies, facilita determinar el riesgo local de transmisión y el mantenimiento de agentes infecciosos (Barasona *et al.*, 2014). Sin embargo, las interacciones en estas interfaces son difíciles de medir o caracterizar, por lo que frecuentemente el riesgo de transmisión sólo se puede estimar usando tasas como la tasa de contacto (Cappelle *et al.*, 2011).

Aunado a lo anterior, las asociaciones entre antropización y la prevalencia de agentes infecciosos en poblaciones de vida silvestre sugiere que a través de una alteración en la estructura del hábitat y cambios en la disponibilidad de recursos, dicha antropización así como la urbanización producirán cambios significativos en la estructura de las comunidades de vida silvestre, que de manera posterior, se caracterizará por albergar una baja biodiversidad con incremento proporcional en la abundancia de ciertas especies generalistas de hábitat (Hassell, Begon, Ward y Fèvre, 2017).

A escala de paisaje, se crea una tendencia decreciente de riqueza de especies de las áreas rurales a los asentamientos humanos con especies sinantrópicas que ocurren en densidades más altas en entornos antropizados o urbanos que en las áreas con menor grado de perturbación (Hassell *et al.*, 2017). Esto genera una mayor tasa de contacto entre hospederos susceptibles debido al aumento de la densidad poblacional de las especies sinantrópicas (a través de cambios en los patrones y densidades de distribución del hospedador) y, por lo tanto, aumenta el riesgo de transmisión de agentes infecciosos (Palacios *et al.*, 2011). Además la transmisión zoonótica inversa, también llamada antroponosis, que va de los seres humanos a los animales puede representar una amenaza para las poblaciones de animales domésticas y silvestres al estar expuestos estos a seres humanos infectados (Hassell *et al.*, 2017).

La sinantropía entonces, es una característica que presentan los animales no domesticados de interactuar en el entorno humano. Esta interacción se ve favorecida por las condiciones de refugio y alimentación que la población humana propicia a través de la modificación de los ecosistemas naturales y la generación de ambientes favorables para el establecimiento de asentamientos humanos. Estas condiciones favorecen que algunas especies con mayor adaptabilidad ecológica encuentran en estos nuevos ecotonos artificiales la posibilidad de satisfacer necesidades básicas para su reproducción y desarrollo, así como ausencia de depredadores o competidores facilitando el incremento poblacional (Ruiz-Piña y Reyes-Novelo, 2013).

Algunos ejemplos de animales sinantrópicos son los roedores del género *Peromyscus*, reservorios de hantavirus, diferentes especies de aves migratorias que participan en la ecología del virus del Oeste del Nilo, así como perros (*Canis lupus familiaris*) y gatos (*Felis catus*) que forman parte del ciclo de transmisión de rickettsiosis y filariasis (Long *et al.*, 2019; Pandit *et al.*, 2018; Reyes-Novelo, 2011). De igual forma, muchas de las especies con comportamiento sinantrópico son especies exóticas invasoras. Las especies invasoras son una de las principales causas de pérdida de biodiversidad a nivel mundial (Cuthbert, Callaghan y Dick, 2019) y su repercusión en la transmisión de enfermedades es de suma importancia.

ESPECIES EXÓTICAS INVASORAS

Las especies exóticas invasoras son aquellas introducidas por acción humana, intencional o accidentalmente, en un ecosistema que se encuentra fuera de su área de distribución natural y cuyas características biológicas les confieren la capacidad de colonizar, establecerse y

causar daños al ambiente (Aguirre *et al.*, 2009). La Ley General de Vida Silvestre, define a una especie exótica invasora, como aquella especie o población que no es nativa, encontrada fuera de su ámbito de distribución natural, capaz de sobrevivir, reproducirse y establecerse en ecosistemas naturales y que amenazan la diversidad biológica nativa, la economía y la salud humana (DOF, 2016). Mientras que la Unión Mundial para la Naturaleza (UICN) define a una especie invasora como aquella especie exótica o trasladada que ha sido introducida accidental o intencionalmente fuera de su distribución natural, y que tiene la capacidad de colonizar, invadir y persistir, y su introducción y dispersión amenazan la diversidad biológica, causando daños al ambiente, a la economía y a la salud humana (UICN, 2019).

Con frecuencia se utilizan de manera indistinta los términos “especies invasoras”, “introducidas”, “exóticas”, “no nativas”, “no indígenas”, entre otros, para referirse a estas especies. Sin embargo, el concepto de especies invasoras no debe confundirse con el de especies exóticas, que si bien las especies exóticas pueden tornarse como especies invasoras, en algunos casos no sucede de esta manera (Aguirre *et al.*, 2009; Álvarez-Romero *et al.*, 2008).

Durante el proceso de invasión de una especie, se pueden reconocer tres fases: introducción, establecimiento y expansión. Después del establecimiento, las especies invasoras tienen el potencial de proliferar y diseminarse dañando los intereses humanos, los ecosistemas y la biodiversidad (Genovesi y Shine, 2000). Las vías de introducción de estas especies son múltiples, debido a varios factores, como la deficiencia en la vigilancia de los sistemas fronterizos y la falta de medidas de prevención y control en estos. La globalización y el incremento en la eficacia del transporte han propiciado la entrada masiva, intencional o

accidental, de especies exóticas a los ecosistemas. Sin embargo, también existen vías de dispersión natural, como los ríos, las corrientes marinas y la vía aérea que facilitan el movimiento sin control de muchas especies, como es el caso de algunas aves (Aguirre *et al.*, 2009).

Las especies invasoras son responsables de un elevado número de extinciones y de otros daños ambientales, que se presentan de manera exacerbada en regiones insulares, como consecuencia de la depredación, la competencia, la alteración del hábitat, el sobrepastoreo y los daños al suelo (Catford, 2018). Además de los impactos directos, la mayoría de especies exóticas invasoras acarrear numerosos efectos indirectos que pueden ocasionar cambios en las comunidades y en los ecosistemas tales como la introducción de enfermedades, la transmisión, mantenimiento y propagación de estas (Solís, Arnaud, Álvarez, Galina, 2009; Wehr, Hessand y Litton, 2017).

Existen diversos ejemplos de especies exóticas invasoras que van desde plantas como *Bromus tectorum* una especie herbácea perteneciente a la familia de las gramíneas que ha degradado millones de hectáreas de áreas naturales en todo el mundo o la palma aceitera africana (*Elaeis guineensis*) que actualmente es de las principales causas de deforestación en los bosques tropicales (Aguirre *et al.*, 2009; Luskin *et al.*, 2017). Otro ejemplo sería el caso del mosquito tigre *Aedes albopictus*, un mosquito asiático altamente invasivo, cuya expansión por África, América y Europa comenzó a finales de los años 70's, representando una amenaza para la salud pública por ser el vector de enfermedades virales como dengue, fiebre amarilla y virus del Oeste del Nilo (Cuthbert *et al.*, 2019). Dentro de la fauna doméstica también se cuenta con otros ejemplos de especies exóticas invasoras, como es el caso de los gatos domésticos (*Felis catus*), que se encuentran entre las especies introducidas con mayor

potencial de daño, ya que han sido responsables de la extinción o disminución de numerosos mamíferos, aves y reptiles, particularmente en los ecosistemas insulares (Maeda, Nakashita, Shionosaki, Yamada y Watari, 2019). Un último ejemplo son los cerdos asilvestrados (*Sus scrofa*), reconocidos como una de las especies con mayor capacidad de invasión de nuevas áreas (Lowe, Browne, Boudjelas y De Poorter, 2000) y que causan mayores daños al ambiente (Barrios-García y Ballari, 2012).

EL CERDO ASILVESTRAO (*Sus scrofa*) COMO ESPECIE EXÓTICA INVASORA

Origen y distribución

Los cerdos asilvestrados (*Sus scrofa*) (Linnaeus, 1758) se originaron por diversas causas ligadas a actividades antropogénicas. Se considera que son cerdos domésticos, jabalí europeo, e híbridos de estos, que han coincidido en tiempo y espacio (Wehr *et al.*, 2017; Mayer, 2000). En el caso de las poblaciones de cerdos domésticos que fueron liberados y se han establecido en diferentes hábitats, al paso del tiempo y de generaciones, han ido recuperando características fenotípicas del agriotipo que les dio origen, el jabalí euroasiático. Estas poblaciones se han reproducido con el jabalí europeo en algunas partes donde este ha sido traslocado y es considerado una especie exótica, dando origen a individuos con diferente grado de hibridación, por lo cual el fenotipo de estos animales es sumamente variado, lo que ha generado confusión sobre su taxonomía (Figura 1) (Mayer, 2000; Adeola *et al.*, 2017; Barrios-García y Ballari, 2012; Ditchkoff y West, 2007; Hidalgo-Mihart *et al.*, 2014; Álvarez-Romero *et al.*, 2008; Wehr *et al.*, 2017; West, Cooper y Armstrong, 2009). Recientemente, la implementación de pruebas genéticas para diferenciar entre jabalí europeo,

linajes de cerdos domésticos e híbridos de estos, ha permitido a los investigadores realizar un seguimiento de las introducciones históricas poblacionales así como una distinción clara del origen de los cerdos asilvestrados (Wehr *et al.*, 2017).

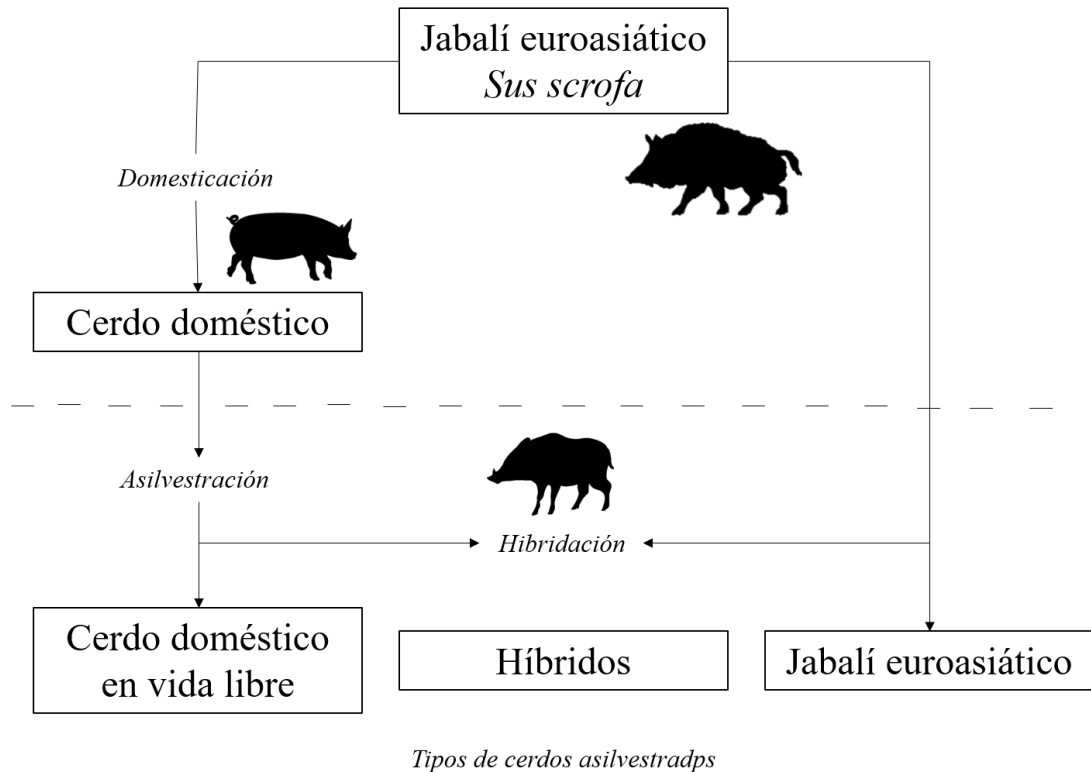


Figura 1. Clasificación taxonómica de los cerdos asilvestrados. Se muestran los tres tipos de cerdos asilvestrados, el cerdo doméstico en vida libre, el jabalí euroasiático (donde su distribución es exótica) y los híbridos de estos. Adaptado de (Mayer, 2009).

Los cerdos asilvestrados son nativos de Europa, Asia y África del Norte, el Género *Sus* incluye al jabalí barbudo (*Sus barbatus*), el jabalí vietnamita (*Sus bucculentus*), el jabalí de Bisayas (*Sus cebifrons*), el jabalí verrugoso de Célebes (*Sus celebensis*), el jabalí filipino (*Sus philippensis*), el jabalí verrugoso de Oliver (*Sus oiveri*), el jabalí enano (*Sus salvanius*), el jabalí verrugoso de Java (*Sus verrucosus*), el jabalí barbudo de Palwan (*Sus ahoenobarbus*) y el jabalí euroasiático (*Sus scrofa*), del cual descienden la mayoría de las razas porcinas que

fueron domesticadas. Sin embargo, existen estudios con estimaciones de reloj molecular que demuestran que existieron diferentes puntos de domesticación a partir de linajes divergentes de jabalíes ya que se han identificado tres grupos distintos de *Sus scrofa*, un clado asiático y dos grupos europeos. Esto ha generado mayor diversidad genética en los cerdos asilvestrados por provenir de tres diferentes grupos de animales, cerdo doméstico (diferentes razas con diversos orígenes), jabalí europeo e híbridos de estos (Ramos-Onsins, Manunza y Amills, 2014; Giufra *et al.*, 2000; Larson *et al.*, 2005) (Figura 2).

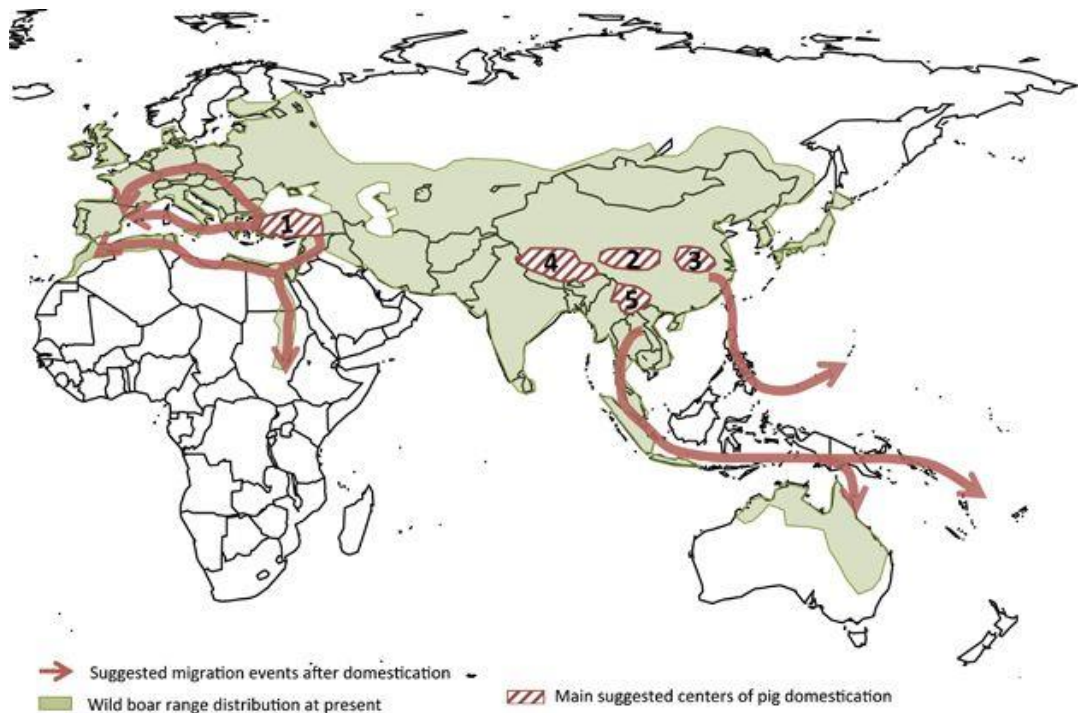


Figura 2. Puntos de domesticación del cerdo y distribución nativa del jabalí. Mapa que muestra el sudeste asiático, como origen de las especies de jabalíes (*Sus scrofa*, *Sus celebensis*, *Sus verrucosus*, *Sus barbatus*, *Sus philippensis* y *Sus cebifrons*), y la distribución geográfica actual del jabalí. También se indican (áreas alineadas) centros de domesticación de cerdos en el Cercano Oriente (Anatolia, # 1) y China (se han informado múltiples centros de domesticación en las regiones aguas arriba # 2 y aguas abajo # 3 del río Yangtze, la Meseta Tibetana # 4 y la región Mekong # 5, pero hasta ahora los datos no son concluyentes). Las rutas de dispersión potenciales de estos centros de domesticación también se muestran con flechas marrones. También se han propuesto centros de domesticación crípticos, sin apoyo zoológico, en el sudeste asiático, India y otros lugares. Tomado de (Ramos-Onsins *et al.*, 2014).

Actualmente la distribución de los cerdos asilvestrados ocupa todos los continentes excepto la Antártida, llevando así al establecimiento de poblaciones asilvestradas en gran parte del mundo (Adeola *et al.*, 2017; Pérez-Rivera *et al.*, 2017; Solís, Arnaud, Álvarez, Galina, 2009; Tisdell, 2011; West *et al.*, 2009). Esta distribución se debe a la introducción antropogénica de cerdos domésticos y jabalíes euroasiáticos con fines de alimentación y en el caso particular de los jabalíes europeos, con fines de cacería cinegética, estos eventos se han documentado desde la época de la colonización humana y la conquista a varios continentes (Mayer, 2000). Sin embargo, existen países en los que se denota ocurrencia de cerdos asilvestrados, pero se desconoce con exactitud su distribución como se muestra en la figura de Barrios García y Ballari (2012) (Figura 3).



Figura 3. Distribución mundial de *Sus scrofa*. La gama nativa de la especie se muestra en negro y la gama introducida en gris. Los círculos grises indican las islas donde se ha introducido *S. scrofa* y (?) denota ocurrencia, pero distribución desconocida. Tomado de (Barrios-García y Ballari, 2012).

Rasgos de historia de vida

Los cerdos asilvestrados también conocidos como “cerdos alzados”, “cerdos ferales”, “cerdos rusos”, “cerdos feroces” o “cerdos salvajes”, son llamados de diferente forma de acuerdo con la región o lugar donde se encuentren. Son generalistas de hábitat y de dieta, al ser omnívoros se adaptan a cualquier tipo de hábitat, aunque prefieren los climas templados, se reproducen prolíficamente debido a que las hembras son poliéstricas continuas con un ciclo estral de 21 días, el tamaño de camada varía entre 4-12 lechones por camada, con una a dos camadas al año (Solís, Arnaud, Álvarez, Galina, 2009; Tisdell *et al.*, 2011; West *et al.*, 2009). El ámbito hogareño de manera general es de 0.62 a 48.3 km², siendo amplio y por ende su capacidad de dispersión es alta (Fattebert, Baubet, Slotow y Fischer, 2017). En el caso particular de las hembras se ha registrado un ámbito hogareño de 0.3 a 7.2 ± 1.8 Km² y en el caso de los machos se ha registrado un ámbito hogareño de 3.1 a 48.3 ± 4.3 Km², en ambos casos esta dispersión depende de una serie de factores como el tipo de vegetación, la región geográfica, la disponibilidad de alimento y agua, la temporada del año, la etapa fisiológica en la que se encuentren y la densidad local de cerdos asilvestrados (Wehr *et al.*, 2017; Mayer, 2009; Mcilroy, 1990; Hampton, 2004; Salbosa, 2009). La densidad poblacional va de 12 a 43 cerdos por Km² en áreas sin cacería y de 3 a 8 cerdos por Km² en sitios cercanos a la cacería, pero estos valores se ven afectados por los factores ya mencionados (Mcilroy, 1990; Mayer, 2009).

En cuanto a sus características morfológicas, estas muestran gran variabilidad derivada de los orígenes taxonómicos y ancestrales diversos de estos individuos, por lo que la descripción física se hace de manera general. El tamaño de los cerdos asilvestrados va de mediano a grande, con un cuerpo robusto en forma de barril, relativamente largo, miembros torácicos y

pélvicos cortos y delgados, cada uno con cuatro falanges, la cabeza es puntiaguda con cuello corto. Los ojos son pequeños, las orejas son grandes y anchas, que se estrechan hasta la punta. El pelo es liso, erizado y oscuro. La cola está cubierta de pelo, especialmente hacia la punta, puede variar de recta a rizada (Cuadro 1) (Mayer, 2009; Wehr *et al.*, 2017). Tienen gran rusticidad, por lo que se piensa que son más resistentes a las enfermedades infecciosas.

Cuadro 1. Resumen de siete medidas corporales externas de 358 cerdos asilvestrados adultos. Los datos se segregaron por sexo e incluyeron una muestra combinada de jabalí euroasiático, cerdos asilvestrados e híbridos. Adaptado de (Mayer, 2009).

Medición (mm)	Sexo	N	Promedio	Rango de observaciones	Desviación estándar	Diferencia de porcentaje
Longitud total	F	174	1594.4	1045 – 1910	143.0	5.5
	M	184	1682.4	1160 – 2083	160.2	
Longitud cabeza-cuerpo	F	174	1305.3	840 – 1580	116.4	5.8
	M	184	1380.9	950 – 1750	129.6	
Longitud de la cola	F	174	288.5	130 – 395	46.7	4.5
	M	184	301.6	90 – 410	60.5	
Longitud del pie trasero	F	174	269.8	185 – 333	23.2	5.6
	M	184	285.3	200 – 380	24.4	
Longitud de oreja	F	174	149.9	86 – 204	21.5	4.7
	M	184	157.2	92 – 250	24.4	
Altura a la cruz	F	174	698.4	515 – 1000	70.3	9.2
	M	184	761.8	535 – 1060	95.5	
Longitud del hocico	F	174	226.6	155 – 305	27.3	7.5
	M	184	244.4	160 – 368	31.7	

El cerdo asilvestrado en la interfaz entre animales silvestres, domésticos y seres humanos

Los cerdos asilvestrados además de causar daños a los ambientes conservados y producciones agrícolas, también han sido asociados con la transmisión y mantenimiento de agentes infecciosos relacionados con animales domésticos, silvestres y seres humanos (Wehr *et al.*, 2017).

La caracterización de la interfaz entre humanos, animales domésticos y silvestres se ha identificado como una herramienta clave y esencial para el control de enfermedades infecciosas emergentes (Cappelle *et al.*, 2011).

Dentro de la interfaz cerdos asilvestrados, animales domésticos y agentes infecciosos, destacan los causantes de peste porcina africana, fiebre porcina clásica, enfermedad de Aujesky, tuberculosis bovina, entre otros (Gortázar *et al.*, 2007; Essey *et al.*, 1983, Machackova *et al.*, 2003, Naranjo *et al.*, 2007 y Wehr *et al.*, 2017). Sin embargo, varios de estos agentes infecciosos también causan enfermedades en poblaciones silvestres, en este sentido el riesgo de contacto con poblaciones de cerdos asilvestrados reservorios o enfermos, es mayor para poblaciones de animales silvestres amenazados o en peligro de extinción (Wyckoff, Henke, Campbell, Hewitt y VerCauteren, 2009).

En el caso de la interfaz humano, cerdos asilvestrados y agentes infecciosos, sobre todo en el caso de los cazadores, quienes mantienen una mayor tasa de contacto con los cerdos asilvestrados, se han asociado enfermedades como encefalitis japonesa y brucelosis en Japón (Watarai *et al.*, 2006, Nidaira *et al.*, 2007), virus de la hepatitis E en Japón y Australia (Meng *et al.*, 2009), triquinelosis en Papua, Nueva Guinea (Owen *et al.* 2005) y virus de influenza porcina (Meng *et al.*, 2009).

En el caso particular de las enfermedades virales encontradas en cerdos asilvestrados, influenza A se encuentra dentro de las de mayor preocupación por las características ecológicas y evolutivas que caracterizan a este virus y a este hospedero que, por su distribución, hábitos, anatomía, entre otras, puede participar de forma importante en la dinámica de estas interacciones ecológicas y evolutivas (Martin *et al.*, 2017).

VIRUS DE INFLUENZA A

El virus de influenza es un virus RNA de cadena simple, de sentido negativo, perteneciente a la familia Orthomyxoviridae, está compuesto de 8 segmentos y su genoma consta de 13,588 nucleótidos aproximadamente (Cuadro 2, Figura 4). Con base en sus diferencias antigénicas existentes entre su nucleoproteína y la proteína de matriz, se dividen en los tipos A, B, C y D o *Alfainfluenzavirus*, *Betainfluenzavirus*, *Gamainfluenzavirus* y *Deltainfluenzavirus* respectivamente, de acuerdo con la última nomenclatura oficial publicada por el “International Committee on Taxonomy of Viruses” (ICTV) (Mc Cauley *et al.*, 2012; ICTV, 2019). Los virus de influenza A poseen distintos subtipos de acuerdo con las 16 hemaglutininas y 9 neuraminidasas encontradas en aves silvestres (Arbeláez, Calderón, Rincón, Lora y Mercado, 2008; Ong *et al.*, 2009). Actualmente se sabe de la existencia de dos nuevos subtipos de hemaglutinina y neuraminidasa (Rejmanek, Hosseini, Mazet y Daszak, 2015). Estos virus recientemente identificados son el H17N10 y el H18N11 encontrados en hisopos rectales de murciélagos *Sturnira lilium* y *Artibeus jamaicensis* (Short *et al.*, 2015).

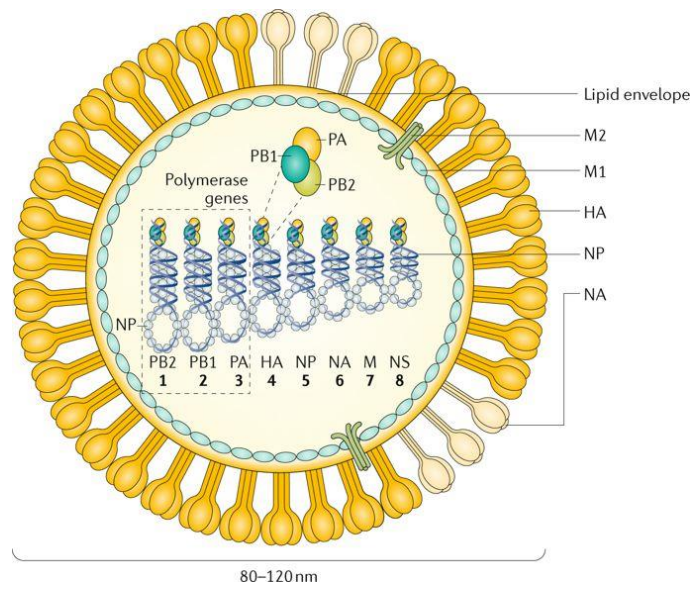


Figura 4. Virus de influenza A. Tomado de (Krammer *et al.*, 2018).

Cuadro 2. Genes y proteínas de virus de influenza A. Adaptado de (Gramer, 2005; Muñoz-Medina *et al.*, 2015).

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

Características ecológicas y evolutivas

Las características ecológicas y evolutivas del virus de influenza A, favorecen que estos virus sean únicos en muchos aspectos, desde la gran diversidad de hospederos que infectan (aves

silvestres acuáticas, aves domésticas, seres humanos, porcinos, equinos, caninos, mamíferos marinos, entre otros) (Figura 5) hasta su capacidad única para evolucionar y adaptarse, mediante saltos taxonómicos, que en algunos casos permite el establecimiento en nuevas especies. Esto debido a su genoma segmentado que le confiere una evolución continua, que es mucho mayor en las glucoproteínas de superficie, pero también ocurre en menor grado en cada uno de los ocho segmentos génicos, utilizando dos mecanismos clave que determinan esta variabilidad, uno de ellos es llamado “DRIFT” o deriva antigénica y el otro “SHIFT” o reordenamiento antigénico (Rajao y Vincent, 2015; Short *et al.*, 2015; Stephenson y Nicholson, 2001).

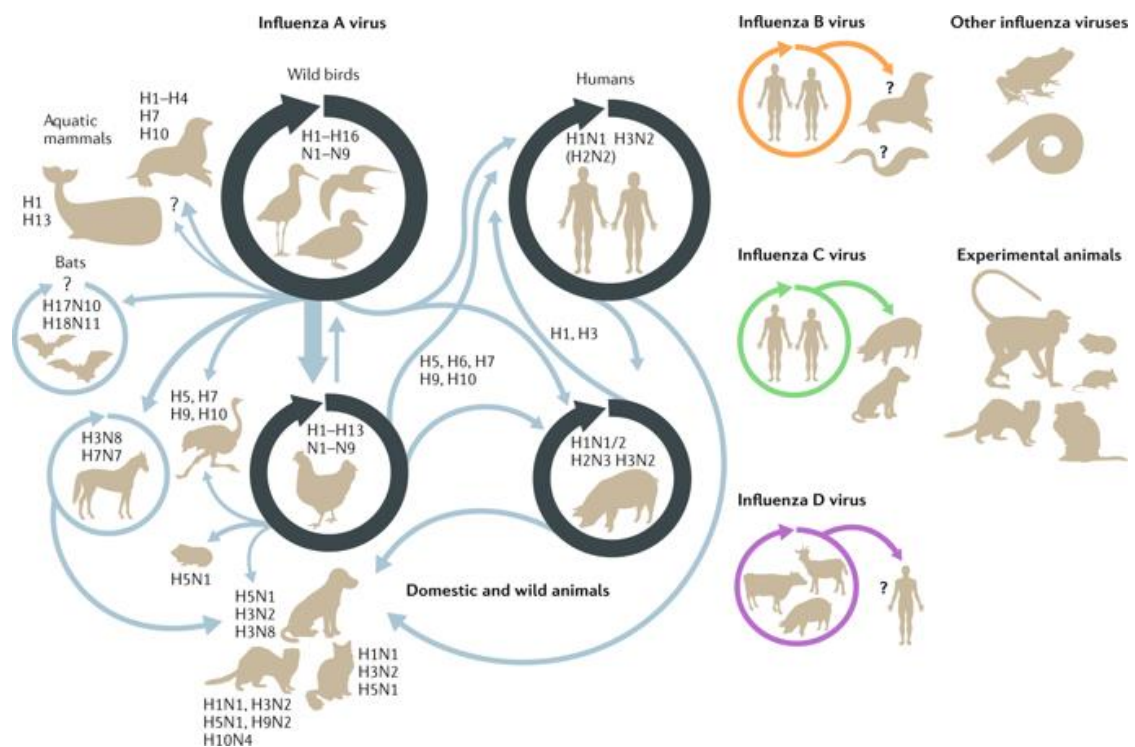


Figura 5. Hospederos del virus de la influenza por especies. Tomado de (Long *et al.*, 2018).

La deriva antigénica se debe a la acumulación de mutaciones puntuales en genes, que resultan en cambios de aminoácidos en las proteínas de la superficie HA y NA, así como a genes internos. Los cambios en la secuencia de aminoácidos pueden alterar los sitios antigénicos sobre la molécula, de este modo es posible que el virión escape al reconocimiento por el sistema inmune del hospedero. Una variante debe experimentar dos o más mutaciones antes de que surja una cepa nueva de importancia epidemiológica (Bedford *et al.*, 2015; Zambon, 1999). Por medio de este mecanismo es como se generan los virus de tipo estacional (Brown, 2000).

El cambio antigénico por otro lado se trata de alteraciones antigénicas importantes en la HA y NA, que conducen a la aparición de un nuevo subtipo de influenza. Los segmentos genómicos virales del virus de influenza se redistribuyen con facilidad en las células doblemente infectadas, generando así alteraciones drásticas en la secuencia de una proteína de la superficie viral. Estos cambios son demasiado grandes para poderlos considerar como una mutación (Bedford *et al.*, 2015; Zambon, 1999). Es probable que el cambio antigénico esté dado por el entrecruzamiento o reordenamiento genético entre virus de influenza humanos, animales, especialmente los de origen aviar y porcino (Vries *et al.*, 2010) (Figura 6).

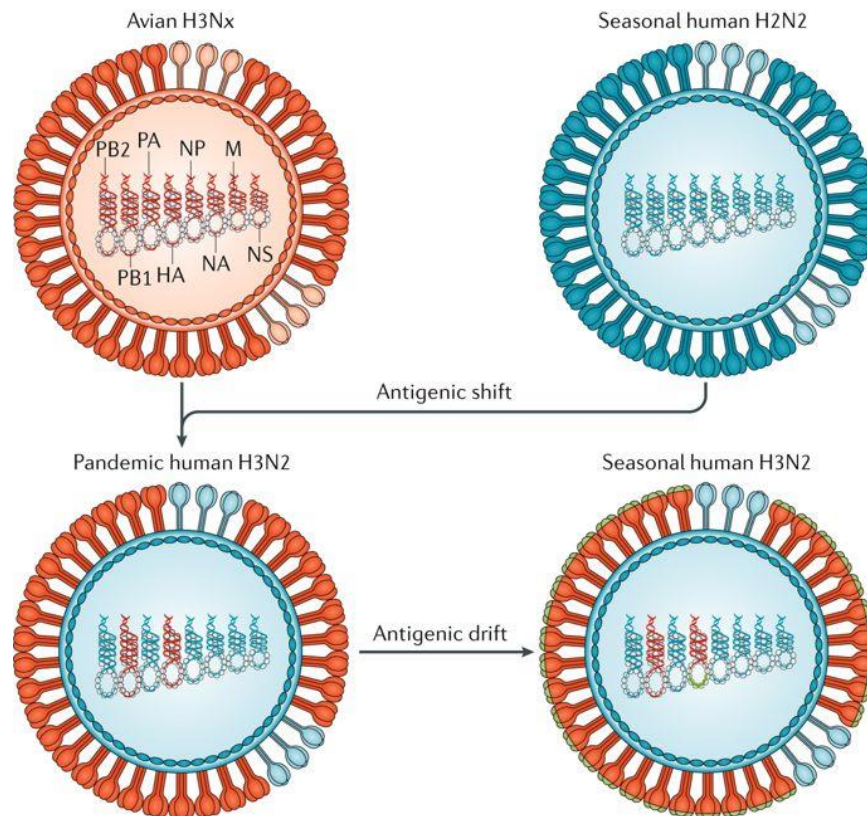


Figura 6. Virus de influenza A. Tomado de (Krammer *et al.*, 2018).

La infección en cerdos asilvestrados por el virus de influenza con subtipos que provienen de aves, humanos u otras especies, coloca a esta especie como un hospedero propicio para generar nuevas variantes virales patógenas, no solo por las características ya mencionadas, sino también por la distribución de sus receptores principalmente en tráquea de ácido siálico $\alpha 2,3$ -galactosa (Saa2,3-Gal) y $\alpha 2,6$ -galactosa (Saa2,6-Gal). Los virus aviares tienen predilección por los primeros receptores y los virus humanos por los segundos, por lo que el cerdo puede ser infectado por ambos (Graaf y Fouchier, 2014). Además de las características moleculares de la especie, es importante mencionar las interacciones directas e indirectas que el cerdo asilvestrado tiene con los nichos ecológicos de animales silvestres, principalmente

aves migratorias, animales domésticos, sobre todo de producciones de traspatio o tipo familiar y contacto con los seres humanos.

CERDO ASILVESTRADO Y VIRUS DE INFLUENZA A: SITUACIÓN EN MÉXICO

Se ha documentado la presencia de poblaciones de cerdos asilvestrados en algunas sierras al sur de la península de Baja California, en el centro de Chihuahua, oeste de Coahuila, extremo norte de Nuevo León y al noroeste de Tamaulipas (Hidalgo-Mihart *et al.*, 2014; Solís-Cámara *et al.*, 2009).

En Campeche, Hidalgo y colaboradores (2014) obtuvieron 14 fotografías de cerdos asilvestrados en tres sitios diferentes dentro del Área de Protección de Flora y Fauna Laguna de Términos (APFFLT) y zonas adyacentes durante el desarrollo de un estudio de foto trapeo entre el 2012 y 2013. Este fue el primer reporte documentado de una población de cerdos asilvestrados en el APFFLT y del sureste de México (Hidalgo-Mihart *et al.*, 2014). Desde el punto de vista biológico, la presencia de especies invasora como el cerdo asilvestrado genera gran preocupación dentro del APFFLT por los posibles impactos que puede generar a la flora y fauna nativa, tomando en cuenta que la región presenta una alta diversidad de especies, entre ellas, mantiene poblaciones de especies que se creían extintas, como es el caso del pecarí de labios blancos (*Tayassu pecari*), entre otras (Hidalgo-Mihart *et al.*, 2014; CONABIO, 2017).

En la actualidad existen pocos estudios orientados a conocer la relación de agentes infecciosos como influenza A en cerdos asilvestrados, la mayor proporción se ha realizado en EE. UU. y en el caso específico de México, solo existe un estudio en el norte del país en

el que Pérez y colaboradores (2017) trabajaron en la Reserva de la Biósfera Sierra La Laguna, Baja California Sur, reportaron la presencia de anticuerpos contra agentes infecciosos por medio de serología en cerdos asilvestrados, donde encontraron una seroprevalencia del 30.7% para el virus de influenza A. En el centro y sur del país aún no se realiza ningún estudio enfocado a la ecología y epidemiología de enfermedades infecciosas asociadas con cerdos asilvestrados, por lo tanto es necesario conocer cual es el estatus del virus de influenza A en cerdos asilvestrados debido a las repercusiones ecológicas y la importancia que puede tener en salud pública y salud animal así como el impacto ambiental en Áreas Naturales Protegidas como es el caso del APFFLT, donde se ha reconocido la existencia de poblaciones de especies amenazadas o en peligro de extinción.

JUSTIFICACIÓN

Debido a que influenza A es una enfermedad emergente que afecta a una gran diversidad de especies incluyendo al cerdo asilvestrado, que está en contacto con diversas fuentes de infección y transmisión, es importante conocer los subtipos de influenza A que se asocian con estos animales. Es necesario impulsar el desarrollo de aproximaciones eco-epidemiológicas que permitan comprender la asociación entre virus y hospedero, debido a que los cerdos asilvestrados tienen contacto con otros animales silvestres, domésticos y con los seres humanos, lo cual propicia mayor interacción viral entre hospederos.

HIPÓTESIS

El cerdo asilvestrado es una especie generalista de hábitat con una gran capacidad de adaptación a distintos tipos de ambientes conservados y ambientes con diferente grado de antropización, donde interactúa con animales silvestres, animales domésticos y seres humanos, lo cual favorece la diversificación de virus de influenza A debido a que es un hospedero susceptible a la transmisión y al mantenimiento de estos virus.

OBJETIVO GENERAL

Demostrar que la población de cerdos asilvestrados de la región de Laguna de Términos está participando en la transmisión y mantenimiento de virus de influenza A para su integración en la comprensión de la eco-epidemiología del virus de influenza A.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Categorizar a la población de cerdos asilvestrados de Laguna de Términos y zonas aledañas.
2. Determinar la presencia de anticuerpos contra virus de influenza A.
3. Determinar si las muestras son positivas al virus de influenza A y si las mismas tienen virus infectante e identificar los subtipos virales.
4. Categorizar el grado de antropización del paisaje de los sitios de muestreo.
5. Analizar los factores implicados en la ecoepidemiología de los subtipos de influenza A encontrados en la población de cerdos asilvestrados en Laguna de Términos y zonas aledañas.

MATERIALES Y MÉTODO

Área de estudio

El estudio se realizó en los municipios de Carmen y Palizada, ubicados al suroeste del estado de Campeche. Los sitios fueron seleccionados de acuerdo con la presencia de cerdos asilvestrados en cautiverio o con la cacería de estos (Anexo 1), de igual forma se ingresó al Área de Protección de Flora y Fauna Laguna de Términos (APFFLT), con la ayuda y permiso de autoridades de la Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas (CONANP) donde se tenía el reporte de avistamientos de cerdos asilvestrados dentro del área (Anexo 2).

El APFFLT y áreas de influencia forman parte de una planicie inundable a nivel del mar, esta región forma parte de un gran fragmento de vegetación natural conocida como Selva La Montaña, dominada principalmente por asociaciones de vegetación inundable de palmar, bosque tropical caducifolio y subcaducifolio, así como sabanas naturales inundables, también llamadas marismas. Asimismo, en la orilla de los ríos se encuentran asociaciones de manglar y otros tipos de vegetación inundable, tales como popal (*Thalia geniculata*, *Pontederia sagittata* y *Sagittaria lancifolia*) y tular (*Thypha dominguensis*). La región presenta una gran diversidad de especies de vertebrados terrestres y acuáticos (Anexo 3) (Hidalgo-Mihart *et al.*, 2014; CONABIO, 2017).

La toma de muestras biológicas se realizó en 20 sitios, de los cuales 17 pertenecen al municipio de Carmen y 3 al municipio de Palizada, que se encuentran dentro del APFFLT (Figura 7).

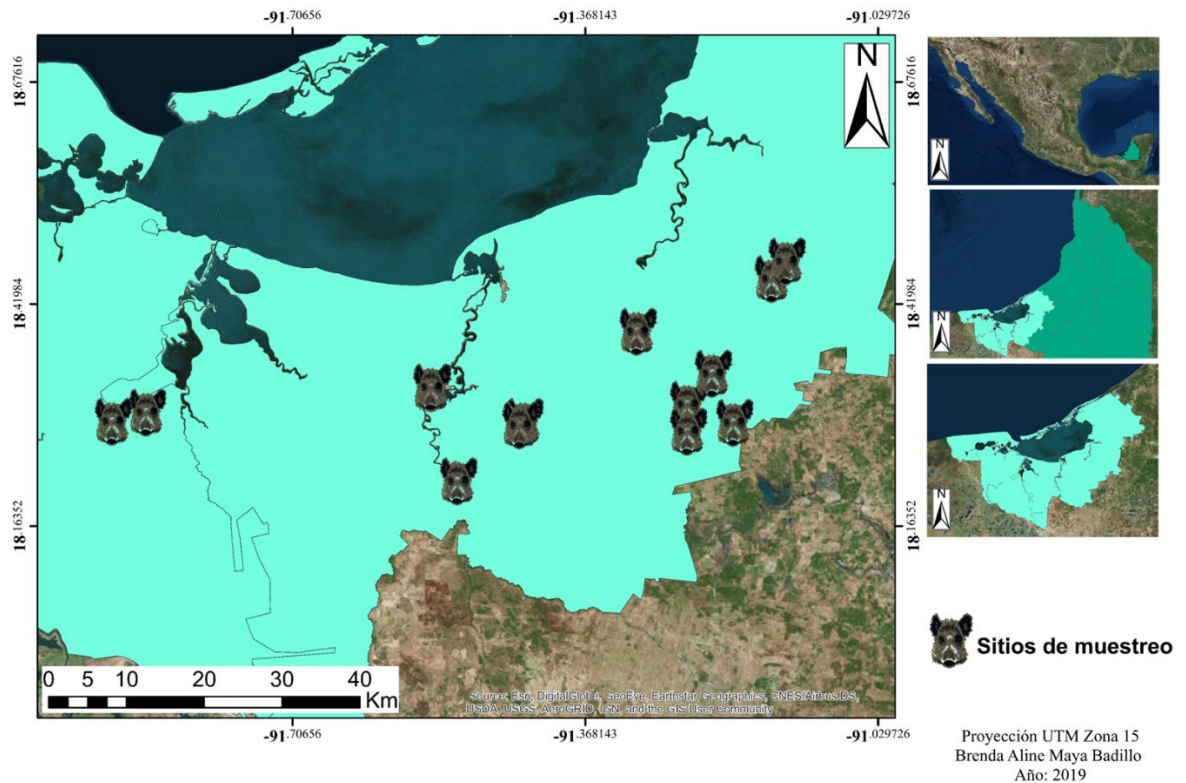


Figura 7. Área de estudio y sitios de muestreo.

Categorización de los animales muestreados

Los animales que fueron muestreados se clasificaron en dos grupos, cerdos asilvestrados libres (Grupo A), incluidos todos los cerdos que son capturados para el muestreo o aquellos que son cazados como fuente de alimento y el otro grupo fue de cerdos asilvestrados cautivos (Grupo B), cerdos que tienen un origen libre pero que fueron capturados y ya llevaban cierto tiempo en confinamiento (de un día como mínimo a 4 semanas como máximo) para aumentar su peso y finalmente ser consumidos.

Los cerdos asilvestrados también fueron clasificados de acuerdo con su fenotipo, para esto se tomaron medidas morfométricas en las que se incluyeron la circunferencia del tórax

(CTR), el largo total (LT), la altura a la cruz (AC), el largo de rostro “hocico” (LH) y el largo de oreja (LO). En el “Grupo 1” fueron incluidos los cerdos con fenotipo asilvestrado que resulta ser muy variado por el grado de hibridación de estos animales, sin embargo, de manera general se observaron estas características para asignarlos a esta categoría: tamaño mediano a grande con respecto a un cerdo doméstico, cuerpo robusto en forma de barril (a menudo aplanado de los costados), pies y manos cortos y delgados, cuerpo relativamente largo, cabeza puntiaguda apoyada en un cuello corto, pelaje negro, liso y erizado a lo largo del dorso, ojos pequeños, orejas peludas relativamente grandes y anchas, que se estrechan en la punta, la cola es corta en longitud y cubierta de pelo, especialmente en la punta, puede variar de recta a rizada (Mayer, 2000) y para el caso del “Grupo 2” fueron incluidos cerdos asilvestrados con fenotipo mezclado, es decir, que cumplían con algunas pero no todas las características de un fenotipo asilvestrado y además aún contaban con algunas características físicas de cerdo doméstico.

Del total de individuos fueron tomadas variables categóricas discretas como el sexo (hembra o macho), la edad (lechón, juvenil o adulto) y el estado reproductivo (reproductivo y no reproductivo).

Toma de muestras, transporte y almacenamiento

De los cerdos asilvestrados del grupo A y B se obtuvieron hisopos nasales, introduciendo el hisopo en la cavidad nasal y rotándolo en las paredes de este, posteriormente se colocaron dentro de un tubo de plástico de 15 mL el cual contaba con solución salina buffer (PBS) como

conservador de la muestra para ser transportada en congelación con nitrógeno líquido (-195.8°C) y posteriormente almacenarla a -70°C hasta su procesamiento.

Se tomaron también de los cerdos asilvestrados del grupo A, órganos clave en la infección por virus de influenza A, como lo son: tráquea, pulmón, y linfonodos mediastínicos; estos fueron almacenados en vasos de plástico congelados en nitrógeno líquido (-195.8°C) para su transporte, después fueron almacenados a -70°C hasta su procesamiento.

De igual forma, tanto en el grupo A como en el B de cerdos asilvestrados, se tomaron 5 mL de muestra sanguínea directamente de la vena yugular, estas muestras se almacenaron en tubos vacutainer sin anticoagulante para su posterior centrifugación y extracción de suero, estas muestras fueron conservadas en refrigeración (4°C) para evitar hemólisis y posteriormente el suero fue congelado a -20 °C hasta su procesamiento, revisar Anexo 4.

El Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales Experimentales (SICUAE) aprobó todos los procedimientos para el manejo y toma de muestras biológicas de los cerdos asilvestrados de nuestro estudio, con número de protocolo MC-2018/2-11.

Inhibición de la hemoaglutinación (IH)

A las muestras de suero se les realizó la técnica de IH por el método beta (suero diluido, virus constante) (Del Castillo *et al.*, 2010).

Antígenos virales

Los siguientes subtipos de influenza A fueron utilizados como antígenos: influenza humana (hH1N1) A/Mexico/INER1/2000(H1N1), con número de acceso de GenBank: JN086908, influenza porcina (poH1N1) A/swine/Mexico/JalDMZC05/2015(H1N1), con número de

acceso al GenBank: MH013200-MH013207, influenza porcina (poH1N2) A/swine/MexMich/DMZC/2014(H1N2), influenza porcina (poH3N2) A/swine/Mexico/HgoDMZC11/2015(H3N2), con número de acceso al GenBank: MH006715-MH006722 e influenza aviar (avH5N2) A/swine/Mexico/EdoMexDMZC03/2015(H5N2), con número de acceso al GenBank: MH013208-MH013215.

1. Tratamiento de las muestras de suero. Todas las muestras fueron previamente identificadas, absorbidas con caolín en microtubos de 2 mL estériles, las cantidades depositadas en cada tubo fueron las siguientes:

- Suero = 300 μ L
- Caolín = 600 μ L
- Eritrocitos de ave al 0.5% = 600 μ L

De tal forma que la dilución quedó 1:5. Las muestras se dejaron en refrigeración a 4°C durante 24 horas para que el caolín, así como los eritrocitos de ave sedimentaran. Transcurridas las 24 h los sueros se centrifugaron a 1500 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos para posteriormente realizar la prueba de IH con los sobrenadantes.

2. Realización de la prueba IH

- a) Fueron utilizadas microplacas en fondo “U” de 96 pozos.
- b) Se colocaron 50 μ L de PBS en todos los pozos de la microplaca.
- c) Posteriormente se depositaron 50 μ L de cada uno de los sueros de la fila “1A” a la fila “1H” de la microplaca.

- d) Se realizaron diluciones dobles seriadas de la fila 1 a la 12 (desde 1:10 hasta 1:20480).
- e) Después fueron colocados 50 μ L de los antígenos virales de los siguientes subtipos de influenza A (H1N1 humano, H1N1 porcino, H1N2 porcino, H3N2 porcino, H5N2 aviar) con 8 Unidades Hemoaglutinantes (UHA) de la fila dos a la 12. A la fila uno no se le agregó antígeno por ser el control de suero. Se dejó un control de virus (50 μ L de PBS + 50 μ L de antígeno en sus respectivas microplacas).
- f) Se dejó incubar a temperatura ambiente por 30 minutos.
- g) Posteriormente se adicionaron 50 μ L de eritrocitos de ave al 0.5% a toda la placa. Fue considerado un control positivo de eritrocitos (50 μ L de PBS + 50 μ L de eritrocitos de ave al 0.5%).
- h) Finalmente se dejó a temperatura ambiente hasta que el control de eritrocitos para después realizar la lectura.

3. Lectura

Fueron consideradas positivas las muestras con títulos mayores o iguales a 1:80 UHA, el título de cada suero se dio en el último pozo donde se observó sedimentación de eritrocitos. La prueba fue realizada para cada uno de los subtipos de influenza A ya mencionados.

- 4. Los títulos se transformaron a logaritmo base 10 para su análisis estadístico.

Extracción del RNA viral

Las muestras de hisopos nasales fueron descongeladas gradualmente y centrifugadas a 5000 rpm durante 10 minutos, posteriormente fueron tomados 200 µL de la muestra para iniciar la extracción del RNA viral, se empleo el kit comercial “QIAamp® cador® Pathogen Mini Kit” (QIAGEN), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Posteriormente se preparó la reacción de qRT-PCR.

Las muestras de órganos fueron maceradas con nitrógeno líquido, después de esto, se preparó una suspensión 1:10 con PBS, la suspensión se mezcló con vórtex durante 5 minutos y posteriormente se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos. Se utilizaron los sobrenadantes para la extracción de RNA viral con el mismo kit de extracción, siguiendo las recomendaciones del fabricante.

qRT-PCR del gen M del virus de influenza A

Para realizar la qRT-PCR fue utilizado el kit comercial VetMAX™-Gold SIV Detection Kit (Life Technologies) dirigido hacia el gen de matriz (M) y al gen de la nucleoproteína (NP). El procedimiento se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante de la siguiente manera:

La mezcla fue preparada para las muestras, así como para el control positivo proporcionado por el kit y los controles negativos (control sin templado NTC, agua libre de nucleasas) con las proporciones mostradas en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Componentes y volúmenes del kit para la preparación de la mezcla de la qRT-PCR.

Componente	Volumen por reacción
Buffer 2X Multiplex RT-PCR	12.5 µL
Enzima mix Multiplex RT-PCR	2.5 µL
Primer cebador mix del virus de influenza	1.0 µL
Agua libre de nucleasas	1.0 µL
Volumen total de la mezcla RT-PCR	17.0 µL

Posteriormente se colocaron 17 µL de la mezcla de qRT-PCR en cada microtubo de 0.2 mL y se le agregaron 8.0 µL de las muestras de extracción de RNA a procesar. Las condiciones de amplificación se presentan en el cuadro 4.

Cuadro 4. Condiciones de amplificación de la qRT-PCR.

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

Se utilizó el Termociclador Rotor-Gene™ Q (QIAGEN).

Para analizar los datos se tomaron en cuenta las siguientes consideraciones:

- Una muestra es considerada positiva siempre que la fluorescencia emitida sea mayor a la de los controles negativos.
- Una muestra es considerada negativa siempre que la fluorescencia emitida sea menor o igual a la de los controles negativos.

- Entre más bajo es el valor de ciclo umbral o Ct de la muestra, mayor es la cantidad de copias genómicas presentes en la muestra.
- Las muestras con un valor de Ct menor a 35 fueron consideradas positivas y con un valor de Ct de 35 a < 40 fueron consideradas sospechosas (Choi *et al.*, 2015).

La extracción del RNA viral, así como la qRT-PCR se realizaron en la Unidad de Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia – UNAM.

Aislamiento viral

Las muestras positivas a la qRT-PCR se intentaron replicar en embrión de pollo libre de patógenos específicos (SPF) para lograr aislar el virus de influenza A. La inoculación de los embriones de pollo se realizó con el sobrenadante de las muestras positivas y el procedimiento para la replicación viral fue el siguiente:

1. Se revisó la viabilidad de los embriones de pollo a su llegada y se descartaron los muertos y débiles.
2. Posteriormente se dejaron descansar por 24 horas y después de esto se realizó la inoculación.
3. Con un lápiz se trazó una línea por encima de la cámara de aire.
4. Se desinfectó con alcohol al 70%, después se perforaron e inocularon con una jeringa de insulina con 200 μ L, en un ángulo de 90°.
5. Se cubrió el orificio con pegamento blanco y fueron incubados a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 72 horas.

6. Diariamente fueron revisados, hasta que se cumplieron 72 horas post-inoculación. Los muertos a las 24 h fueron descartados por traumatismo.
7. El líquido alantoideo de los embriones muertos a las 48 horas, así como los que sobrevivieron a las 72 horas, fue tomado de la siguiente manera:
 - a. La cámara de aire fue desinfectada con alcohol al 70% y se cortó por la línea marcada previamente.
 - b. El líquido alantoideo se tomó con puntas estériles, procurando tomar líquido cristalino y sin yema.
 - c. Posteriormente el fluido obtenido se centrifugó a 3500 rpm a 4°C durante 10 minutos.

Titulación viral. El líquido alantoideo obtenido se tituló por medio de la técnica de “Hemoaglutinación en placa” para corroborar si hubo replicación viral. La metodología de este procedimiento es la siguiente:

En una microplaca de 96 pozos en fondo “U” se colocaron 50 µL de PBS en todos los pozos, posteriormente en el pozo uno, se colocaron 50 µL del líquido alantoideo obtenido de cada embrión y se realizaron diluciones dobles seriadas desde 1:2 hasta 1:4096. Después de ello se colocaron 50 µL de eritrocitos de ave al 0.5% a toda la placa.

La lectura se realizó hasta que el control de eritrocitos sedimentó. Fueron consideradas positivas al aislamiento viral las muestras que presentaron hemoaglutinación y obtuvieron un título de 1:8 UHA, donde se observaba turbidez del líquido en los pozos (unión antígeno – anticuerpo).

Se realizó un segundo y tercer pase del líquido alantoideo obtenido a un nuevo embrión de pollo sucesivamente.

La IH, así como el aislamiento viral se realizaron en el Laboratorio de Investigación (Nivel 3 de Bioseguridad) del Departamento de Medicina y Zootecnia de Cerdos de la FMVZ – UNAM.

Secuenciación

Las muestras positivas a la qRT-PCR y al aislamiento viral fueron sometidas a RT-PCR para la amplificación de los ocho segmentos genéticos del virus, utilizando el kit comercial SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum™ Taq High Fidelity DNA Polymerase (ThermoFisher, Scientific) y un termociclador de punto final. Los productos de RT-PCR fueron visualizados por electroforesis en un gel de agarosa al 2%. Posteriormente, las bibliotecas se prepararon con el kit Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit (ThermoFisher, Scientific) de acuerdo con las indicaciones del fabricante bajo un protocolo de 200 pares de bases (pb). Se determinó la molaridad de las bibliotecas con el kit comercial High Sensitivity DNA Kit (Agilent, Santa Clara, CA). Se preparó una mezcla equimolar de librerías para realizar el templado que se sometió a una amplificación clonal mediante PCR de emulsión con el kit comercial Ion PGM™ Hi-Q™ View OT2 Kit Ion Torrent™ (ThermoFisher, Scientific) en el Ion OneTouch™ 2 System. Posteriormente se realizó la secuenciación del templado con el kit comercial Ion PGM™ Hi-Q™ View Sequencing Kit (ThermoFisher, Scientific) en la plataforma Ion Torrent Genome Machine (PGM). Para el ensamble de las secuencias, fueron seleccionadas las lecturas que obtuvieron un Q Score mayor a 20.

Análisis filogenéticos

Las secuencias de subtipos de virus de influenza A se compararon con secuencias reportadas en el banco de genes (“Gen Bank”), seleccionando aquellos con un porcentaje de identidad superior a 95%, usando la herramienta BLAST (Herramienta de búsqueda básica de alineación local) del NCBI (Centro Nacional de Biotecnología). El análisis filogenético se realizó de forma independiente para cada segmento genómico con el software MEGA 10.1 utilizando el método de máxima verosimilitud para inferir en la historia evolutiva. Finalmente, los árboles fueron editados con el programa FIGTREE v1.4.3 (Saavedra-Montañez *et al.*, 2018).

Caracterización del grado de antropización del paisaje

La caracterización del grado de antropización se realizó mediante la caracterización de la cobertura del paisaje utilizando el software ArcGIS 10.5 (ESRI, Redlands, California, EEUU). El grado de antropización se define como el grado de modificación de un ecosistema original por efectos antropogénicos. La cobertura se refiere a todos los aspectos que forman parte del recubrimiento de la superficie terrestre, estos pueden ser de origen natural o antrópico, por medio de esta clasificación se calculó el índice integrado relativo de antropización (INRA) (Martínez, 2010).

Tomando como base la propuesta metodológica de Martínez (2010), se adaptó la clasificación del INRA para esta investigación, con base en las coberturas vegetales de la región de Laguna de Términos y zonas aledañas.

Para la estimación del grado de antropización se utilizaron imágenes satelitales SENTINEL-2A, la banda número 8 pancromática, con una resolución de 10 m. Se realizó una clasificación supervisada a partir del uso de suelo, en la que se clasificaron cuatro clases (“Bosque”, “Zonas agropecuarias”, “Zonas urbanas” y “Agua”) de acuerdo con la firma espectral que mostraban los diferentes tipos de coberturas. Se hicieron 5 polígonos por cada clase para que la selección fuera más fina.

Posteriormente se definieron 8 unidades de análisis (UA), es decir, el área a la que se le asigna un valor de antropización, estas áreas fueron seleccionadas con base en la distribución de los cerdos asilvestrados, trazando un área de amortiguamiento promedio entre hembras y machos que fue de 25.51 km² (Wehr *et al.*, 2017; Mayer, 2009; Mcilroy, 1990; Hampton, 2004; Salbosa, 2009). Luego de esto, se divide a las UA en partes iguales, a estas unidades se les llama subunidades de análisis (SUA), en este caso cada SUA está representada por un píxel (Martínez, 2010).

Después se asigna un valor de antropización a partir de con la clasificación supervisada, obteniendo tres categorías: “Bosque” que incluye bosques tropicales, humedales y corrientes de agua, “Zonas agropecuarias”, que incluye cultivos, pastizales y tierras de pastoreo y “Zonas urbanas”, que incluyen áreas de asentamientos humanos, sin cobertura forestal, carreteras y caminos (Cuadro 5) (Martínez, 2010; Martínez-Dueñas, 2003).

Cuadro 5. Valor de antropización por tipo de cobertura.

Categoría	Valor de antropización	Tipo de cobertura
A	0	Bosques y humedales
B	0.5	Agrícola y pecuaria
C	1	Urbana

La determinación de los valores de antropización es inherente al área de estudio, lo que le confiere carácter relativo al INRA. Ya identificados los valores de antropización para cada SUA, se estima el grado relativo de antropización por UA con base en la siguiente fórmula:

$$\text{INRA} = (\Sigma\text{SUA}/n) (100)$$

Donde, ΣSUA = la sumatoria del valor de antropización parcial de todas las SUA y n = número total de SUA.

Análisis de datos

Con los datos de individuos positivos en la serología se obtuvo la seroprevalencia estimada, definida como la proporción de cerdos asilvestrados positivos por IH entre el total de animales evaluados, con un nivel de confianza del 95%. De igual forma se obtuvo la prevalencia de animales positivos molecularmente a influenza A, definida como la proporción de cerdos asilvestrados positivos a la qRT-PCR entre el total de animales muestreados, con un nivel de confianza del 95%.

Además de la categorización del grado de antropización y la obtención del INRA, por medio de SIG, se generaron áreas de amortiguamiento de movimiento con base en los valores de la distribución y el ámbito hogareño de los cerdos asilvestrados. Para las hembras se utilizaron tres valores, 0.11 Km, 0.9 Km y 1.69 Km, para los machos se utilizaron los siguientes valores,

1.39 Km, 1.71 Km y 3.92 Km, la decisión de utilizar estos valores se basó en la revisión de literatura científica, tomando un rango de valores mínimos y máximos de ámbito hogareño de los cerdos asilvestrados por sexo (Wehr *et al.*, 2017; Mayer, 2009; Mcilroy, 1990; Hampton, 2004; Salbosa, 2009).

El análisis estadístico de los datos incluyó ajustes de regresión logística (Modelo Lineal Generalizado), utilizando el programa estadístico R y un valor de alfa de 0.05, donde la variable respuesta consistía en una variable binomial, individuos positivos y negativos a la serología, así como a la detección molecular de virus de influenza A y las variables explicativas (independientes) fueron variables cuantitativas continuas como el: INRA, ámbito hogareño y medidas morfométricas y las variables cualitativas discretas utilizadas fueron: sexo, edad y fenotipo (Bewick, Cheek y Ball, 2005).

El modelo de regresión logística está basado en la función *logit*, que se define como el logaritmo natural (ln) de las probabilidades de fracaso:

$$\text{logit}(p) = \ln(p/1-p)$$

Donde p es la probabilidad de fracaso.

Al incorporar más de una variable explicativa (cuantitativa y/o cualitativa), el modelo se escribe de la siguiente manera:

$$\text{logit}(p) = a + b_1x_1 + b_2x_2 + \dots + b_ix_i$$

Donde p es la probabilidad de fracaso y $x_1, x_2 \dots x_i$ son las variables explicativas.

También se incluyó la prueba de Chi cuadrada de independencia de variables, para las variables cualitativas discretas de nuestro estudio (sexo, edad y fenotipo con respecto a la serología (resultado) y a la RT-PCR (resultado), donde utilizamos un valor de alfa de 0.05.

La función para el modelo de Chi cuadrada es la siguiente:

$$X^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

Donde O representa la frecuencia observada, E representa la frecuencia esperada. Mientras que \sum representa la sumatoria de cada observación i.

De igual forma se incorporó una prueba de T para la comparación de medias de las medidas morfométricas tomadas de los grupos fenotípicos “Grupo 1” y “Grupo 2”, para las variables cuantitativas continuas (CTR, LT, AC, LH y LO), donde utilizamos un valor de alfa de 0.05.

La función para el modelo de t student es la siguiente:

$$t_{n+m-2} = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{EEDM}$$

Donde EEDM es el “error estándar de la diferencia de medias”.

RESULTADOS

Categorización de los animales muestreados

Se muestreó un total de 61 animales, de los cuales 35 (57.37%) pertenecen al grupo A (vida libre) y 26 (42.63%) pertenecen al grupo B (cautiverio). En la figura 8 se muestran ejemplos con fotografías que representan a cada grupo. Del total de individuos, 25 (40.98%) forman parte del grupo 1 (fenotipo asilvestrado) y 36 (59.02%) al grupo 2 (fenotipo mezclado), en la figura 9 se muestra un ejemplo de estas categorías, revisar Anexo 5 y 6.

No se detectó una diferencia estadística significativa para comprobar la diferencia entre el “Grupo 1” y “Grupo 2”, basada en las medidas morfométricas asociadas a su fenotipo (Anexo 7).

Del total de los animales muestreados, 33 (54.1%) fueron hembras y 28 (45.9%) fueron machos, en cuanto a su edad, 23 (37.7%) fueron lechones, 18 (29.5%) juveniles y 20 (32.78%) adultos, finalmente 38 (62.3%) eran animales no reproductivos y 23 (37.7%) reproductivos.



Figura 8. Grupo A y Grupo B de cerdos asilvestrados. Se muestran fotografías para ejemplificar los dos grupos en los cuales fueron categorizados los cerdos asilvestrados que forman parte de este trabajo de investigación. A) cerdo asilvestrado cazado perteneciente al grupo de cerdos asilvestrados en libertad, B) cerda asilvestrada utilizada como pie de cría, perteneciente al grupo de cerdos asilvestrados en cautiverio.



Figura 9. Grupo 1 y Grupo 2 de cerdos asilvestrados. 1) cerda asilvestrada con características fenotípicas asilvestradas como el color de pelo, la cresta en el dorso, las orejas grandes y puntiagudas, entre otras, por lo que pertenece al grupo 1, 2) cerdo asilvestrado con características fenotípicas mezcladas, aunque se muestran características como la cresta de pelo en el dorso o las orejas grandes y puntiagudas, aún muestra características de cerdo doméstico como el color de pelo, las manos y pies más largas, entre otras, por lo que pertenece al grupo de cerdos asilvestrados del grupo 2.

Inhibición de la hemoaglutinación

De los 61 individuos muestreados, nueve resultaron positivos a alguno(s) de los subtipos de influenza A. En siete individuos se determinó seroconversión al subtipo H1N1 humano, cinco individuos al subtipo H1N1 porcino y un individuo al subtipo H5N2 aviar con títulos alcanzados que van desde 80 (punto de corte) hasta 2560 UHA (Cuadro 6).

De los 9 individuos positivos, 4 fueron hembras (edades) y 5 machos (edades). Cuatro individuos (identificados como “ElRe1”, “ElRe1a”, “ElRe2a” y “ElRe3a”); mostraron seroconversión para dos subtipos, el H1N1 humano y el H1N1 porcino (Anexo 8), tres cerdos asilvestrados (identificados como “ElRe4a”, “He2” y “He4”) mostraron seroconversión solo para el subtipo H1N1 humano; un individuo (identificado como “Za1a”) con título positivo para el subtipo H1N1 porcino y otro individuo (identificado como “ElRe3”) mostró seroconversión para el subtipo H5N2 aviar.

Con una seroprevalencia total estimada de 14.75% (IC 5.85% - 23.65%), y de manera particular, la seroprevalencia para el subtipo H1N1 humano fue del 11.47%, para el subtipo H1N1 porcino fue de 8.19% y para el subtipo H5N2 aviar fue de 1.63%. Para los subtipos H1N2 porcino y H3N2 porcino no hubo seroconversión positiva (Cuadro 6).

El resto de los individuos no mostró seroconversión para ningún subtipo, permaneciendo por debajo del punto de corte de 80 UHA.

Cuadro 6. Resultados de los cerdos asilvestrados positivos a la serología por medio de la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación. Se observan los resultados positivos para al menos un subtipo de influenza A obtenidos de los sueros de los cerdos asilvestrados por medio de la técnica de Inhibición de la Hemoaglutinación, el punto de corte para considerar a un suero positivo a la prueba contra virus de influenza A son 80 UHA. La lista de variables incluye la seropositividad, seroprevalencia, título de anticuerpos, sexo y edad por el total de cerdos asilvestrados y los cinco diferentes subtipos de influenza utilizados para la prueba.

Variable	n	H1N1 h*	H1N1po*	H1N2po*	H3N2po*	H5N2a*
Total	61					
Seropositividad	9	7	5	0	0	1
Seroprevalencia % (IC: 5.85 – 23.65)	14.75	11.47	8.19	0	0	1.63
Título de Ac (promedio)		595	144	0	0	80
Rango de observaciones		80 – 2560	80 - 320	10	10	80
Sexo						
Hembra	4	4	2	0	0	0
Macho	5	3	3	0	0	1
Edad						
Lechón	4	4	3	0	0	0
Juvenil	2	2	0	0	0	0
Adulto	3	1	2	0	0	1

H1N1 h* = Subtipo humano, H1N1 po* = subtipo porcino, H1N2 po* = subtipo porcino, H3N2 po* = subtipo porcino, H5N2 av* = subtipo aviar.

qRT-PCR del gen M del virus de influenza A

Se obtuvieron 12 muestras positivas a la qRT-PCR de 12 animales diferentes, de las cuales 8 correspondían a hisopos nasales de los individuos identificados como “LoPi1”, “LaN3”, “PC1”, “CL15”, “MH1”, “SL1”, “LJ3” y “LJ4”, 3 correspondían a la tráquea de individuos identificados como “PC3”, “OjA4” y “ElRe3” y una correspondía al pulmón del individuo identificado como “Ag1” como se muestra en el cuadro 7. Los valores mayormente positivos de Ct lo obtuvieron las muestras de hisopo nasal del individuo “LoPi1”, con un valor de 28.43 y la tráquea del individuo “PC3” con un valor de 31.20 (Figura 10) y del individuo “ElRe3” con un valor de 31.72. Del total de individuos positivos molecularmente 6 fueron hembras y 6 machos, distribuidos en distintas edades, tres lechones, dos juveniles y siete adultos, lo que da un total de 12 individuos con una prevalencia estimada del 19.67 % (IC 9.70% - 29.65%) (Cuadro 7).

Cuadro 7. Resultados de los cerdos asilvestrados positivos a la qRT-PCR. En la lista de variables se observa la positividad molecular, la prevalencia molecular, el valor de Ct obtenido en la qRT-PCR, el sexo y la edad, por el total de cerdos asilvestrados, muestras de hisopo nasal, tráquea y pulmón.

Total	60	Hisopo nasal	Tráquea	Pulmón
Positividad molecular	12	8	3	1
Prevalencia % (IC 9.70% - 29.65%)	19.67	13.11	4.91	1.63
Valor de Ct (promedio)		32.94	32.43	34.19
Rango de observaciones		28.43 – 34.36	31.20 – 34.39	34.19
Sexo				
Hembra	6	4	1	1
Macho	6	4	2	0
Edad				
Lechón	3	3	0	0
Juvenil	2	2	0	0
Adulto	7	3	3	1

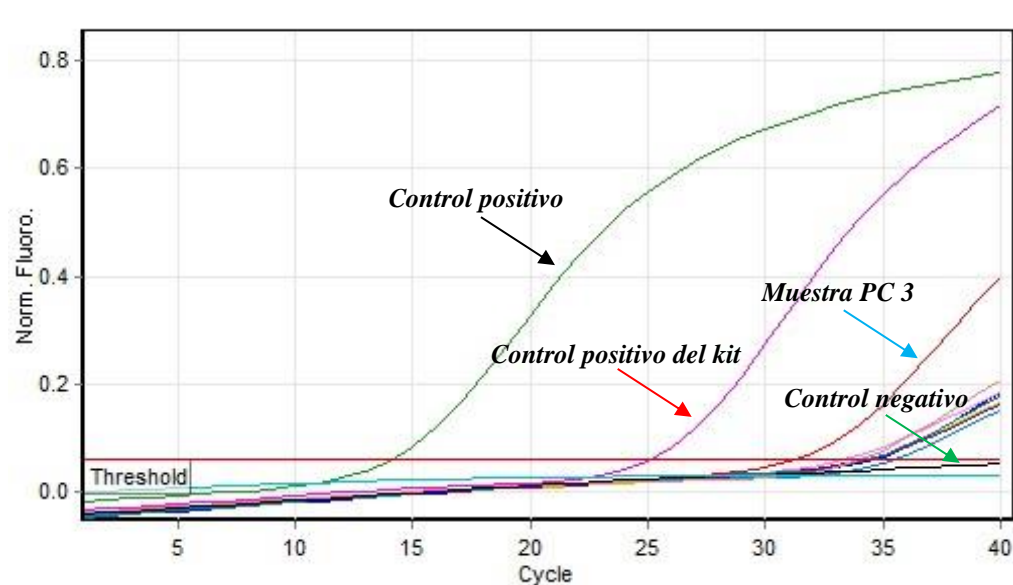


Figura 10. Gráfica de la qRT-PCR. La flecha de color negro muestra el control positivo de influenza de 1:256 UHA, la flecha color roja muestra el control positivo del kit con 1000 copias/ μ L, la flecha color azul muestra la muestra del cerdo asilvestrado “PC3” y la flecha verde señala el control negativo.

Aislamiento viral

Desde el primer pase, se obtuvo el aislamiento viral de la muestra de tráquea de un cerdo asilvestrado, macho, adulto (identificado como “PC3”), con un título de 1:16 UHA y de la muestra de tráquea de otro cerdo asilvestrado, macho, adulto (identificado como “ElRe3”), con un título de 1:32 UHA. El título viral aumentó al segundo pase para el caso de “ElRe3” con un título de 1:64 UHA, mientras que la muestra del “PC3” disminuyó una dilución a 8 UHA. Para el tercer pase el título de “ElRe3” permaneció igual que en el segundo pase, mientras que para “PC3” disminuyó otra dilución a 4 UHA, por lo que para este tercer pase es considerado negativo.

Las 10 muestras restantes positivas a la qRT-PCR no replicaron al ser inoculadas en embrión de pollo y no se obtuvo un título positivo desde el primer pase.

Secuenciación y análisis filogenéticos

Se obtuvo la secuencia del genoma completo del aislamiento del individuo “ElRe3” al igual que de la muestra directa de tráquea de este mismo individuo. El resto de las muestras positivas a la qRT-PCR no amplificaron para los ocho segmentos del virus de influenza y no fue posible crear las librerías para su secuenciación al igual que para el aislamiento del individuo “PC3”.

De acuerdo con el análisis de las topologías inferidas del gen HA, el análisis de secuenciación indicó que la proteína HA del virus Feral swine/Campeche/DMZC-DEFSAL-UIFMVZ19-12 (H5N2) se encontró relacionado a un clado con virus de influenza porcina H5N2 ya reportada en México en 2014 y 2015 en los estados de Guanajuato y Estado de México

respectivamente, al igual que con influenza aviar H5N2, específicamente de aves domésticas y particularmente de pollo. Estos virus fueron aislados en México durante 1994 y 1995. El árbol muestra dos grandes clados, uno correspondiente a virus H5N2 aviar, H5N4 aviar, H5N9 aviar y H5N1 aviar, en su mayoría de Norteamérica, aislados principalmente en aves silvestres como el pato de collar (*Anas platyrhynchos*) y en el cisne de tundra (*Cygnus columbianus*), aunque también se observaron variantes virales de aves domésticas como pavos (*Meleagris gallopavo*) o pollo (*Gallus gallus*). El otro gran clado, corresponde en su totalidad a virus H5N2 aviar y porcino, la mayoría aislados en estados de la República Mexicana y algunos pocos de Taiwán. Este clado abarca virus de influenza H5N2 aislados en aves domésticas (*Gallus gallus*), específicamente pollos y cerdos domésticos (*Sus scrofa*), que es donde se encuentra ubicada la secuencia de HA aislada de cerdo asilvestrado (Figura 11).

A partir de la estructura de las topologías inferidas para el gen NA, el análisis de secuenciación indicó que la proteína NA del virus Feral swine/Campeche/DMZC-DEFSAL-UIFMVZ19-12 (H5N2) se encontró en el clado de los virus de influenza porcina H5N2 mexicanos aislados del estado de Guanajuato en 2014 y del Estado de México en 2015 y con los virus de influenza aviar H5N2 aislados en México en 1994 y 1995. El árbol muestra dos grandes clados, uno correspondiente a virus H5N2 aviar y H6N2 aviar, en su mayoría de estados de la República Mexicana, algunos de Guatemala y pocos de EE. UU., aislados principalmente en aves domésticas como pollo (*Gallus gallus*) y algunos pavos (*Meleagris gallopavo*). El otro gran clado, corresponde en su totalidad a virus H5N2 aviar y porcino, la mayoría aislados en estados de la República Mexicana, y algunos provenientes de Taiwán. Este clado abarca virus de influenza H5N2 aislados en aves domésticas (*Gallus gallus*),

específicamente pollos y cerdos domésticos (*Sus scrofa*), que es donde se encuentra ubicada la secuencia del gen NA aislada de cerdo asilvestrado (Figura 12).

Se uso la estructura de las topologías inferidas para los genes PB2, PB1, PA, NP, M y NS, el análisis de secuenciación indicó que las proteínas del virus Feral swine/Campeche/DMZC-DEFSAL-UIFMVZ19-12 (H5N2) se encontraron en el clado de los virus de influenza porcina H5N2 mexicanos aislados del estado de Guanajuato en 2014 y del Estado de México en 2015 y con los virus de influenza aviar H5N2 aislados en México en 1994 y 1995 con diferencias particulares para cada una de las proteínas mostradas en los árboles filogenéticos de cada uno de los segmentos mencionados (Anexos 9 al 14) respectivamente.

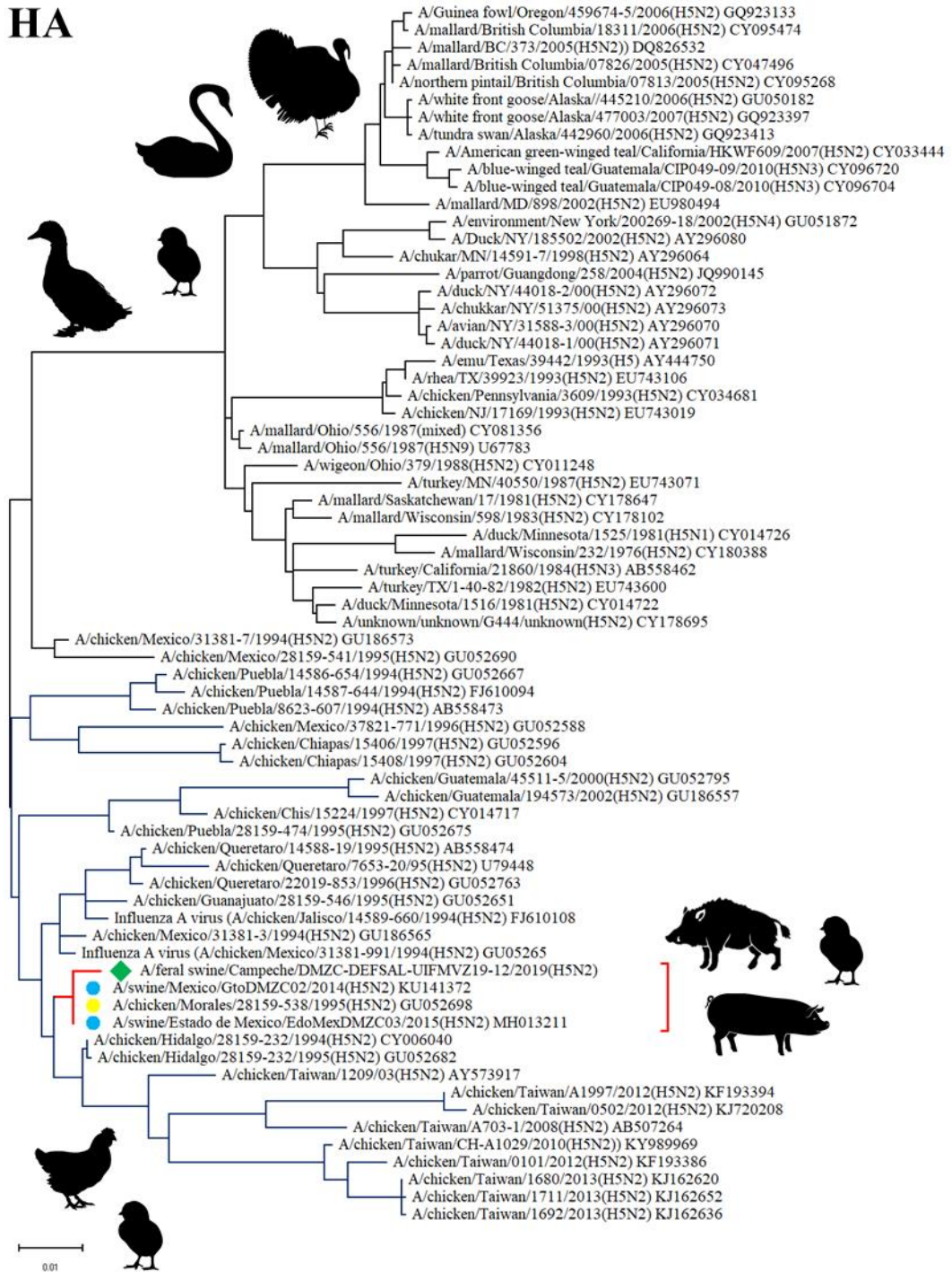


Figura 11. Árbol filogenético del gen HA del virus de influenza H5N2. El árbol se observa a escala, con longitudes de rama correspondientes al número de sustituciones por sitio. El virus H5N2 aislado se encuentra marcado con la siguiente figura: ◆, mientras que los virus porcinos H5N2 se observan marcados con la siguiente figura: ● y el virus aviar H5N2 con la figura: ●.

NA

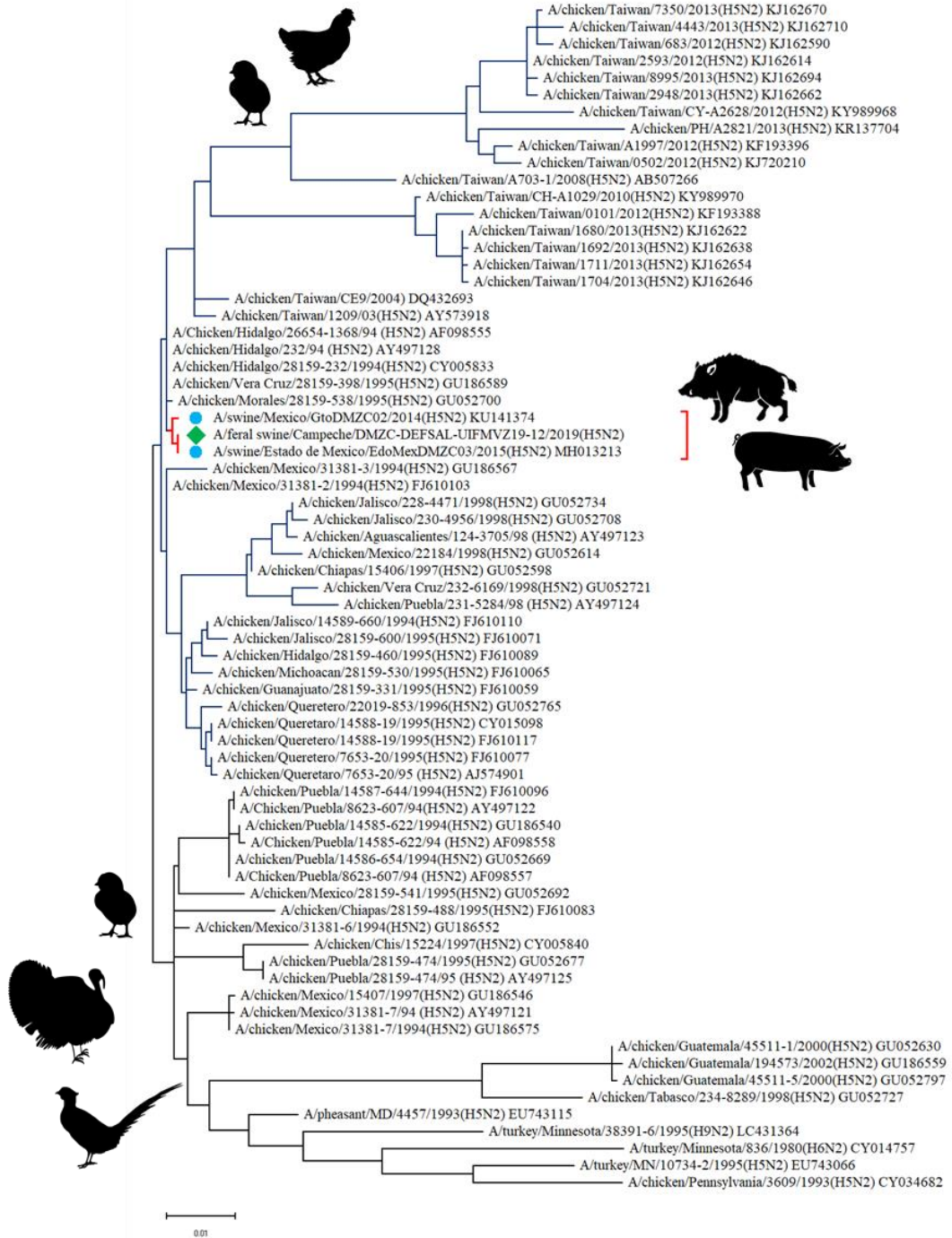


Figura 12. Árbol filogenético del gen NA del virus de influenza H5N2. El árbol se observa a escala, con longitudes de rama correspondientes al número de sustituciones por sitio. El virus H5N2 aislado se encuentra marcado con la siguiente figura: ◆, mientras que los virus porcinos H5N2 se observan marcados con la siguiente figura: ●.

Caracterización del grado de antropización del paisaje

La cobertura que obtuvo mayor predominio fue el “Bosque”, con un 50%, es decir, la categoría con menor valor de antropización, conformada por bosque tropical, humedales, vegetación acuática, pantanos y cuerpos de agua. La categoría de “Zonas agropecuarias” se encuentra muy cercana a la proporción de la categoría de bosque con un 45% (Figura 13).

En la figura 14 se muestra la proporción de coberturas por unidad de análisis y se observa que la cobertura con mayor predominio por UA o cuadrante son las zonas agropecuarias.

De las 8 unidades de análisis (UA), la que obtuvo un menor grado de antropización o INRA fue C1, la cual corresponde con áreas con mayor grado de conservación, que se encuentran dentro del APFFLT, donde predominan humedales, con vegetación acuática y fragmentos de bosque tropical (selva alta perennifolia, selva mediana subcaducifolia y selva baja perennifolia), sin embargo, existen fragmentos de pastizal por las producciones ganaderas que se tienen dentro del ANP (Figura 5). La UA con mayor INRA fue C6, debido a las producciones de agricultura, principalmente plantaciones de palma de aceite (*Elaeis guineensis*), sorgo (*Sorghum sp.*) y maíz (*Zea mays*), además de áreas para pastoreo de ganado y algunos asentamientos humanos y caminos (Cuadro 8, Anexo 15).

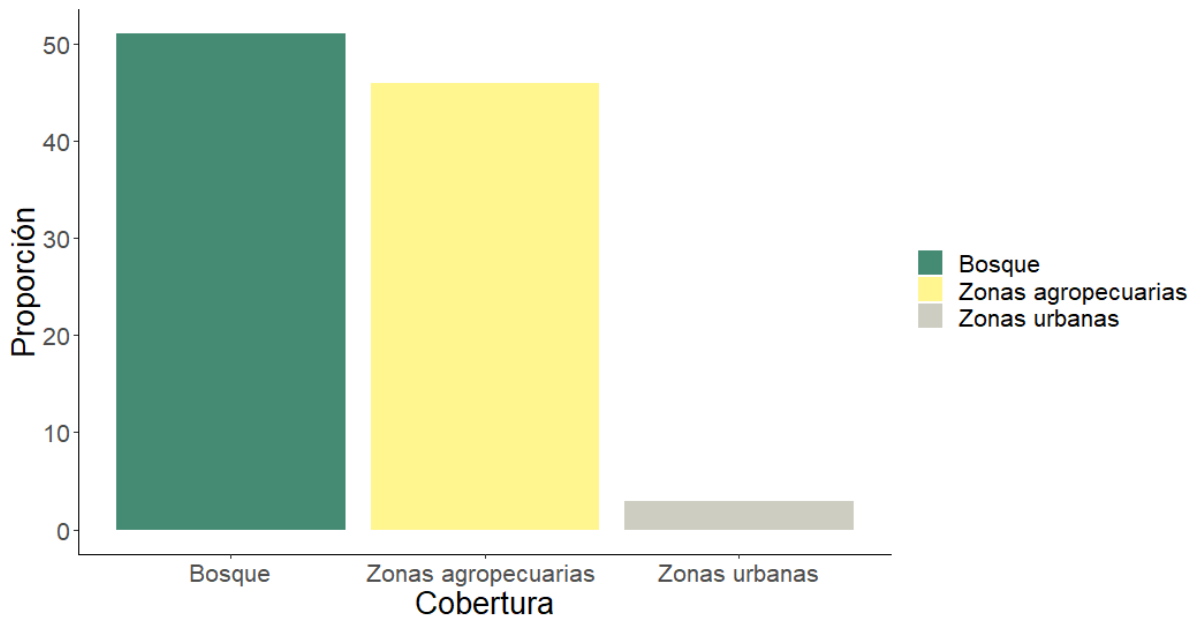


Figura 13. Proporción de coberturas en general.

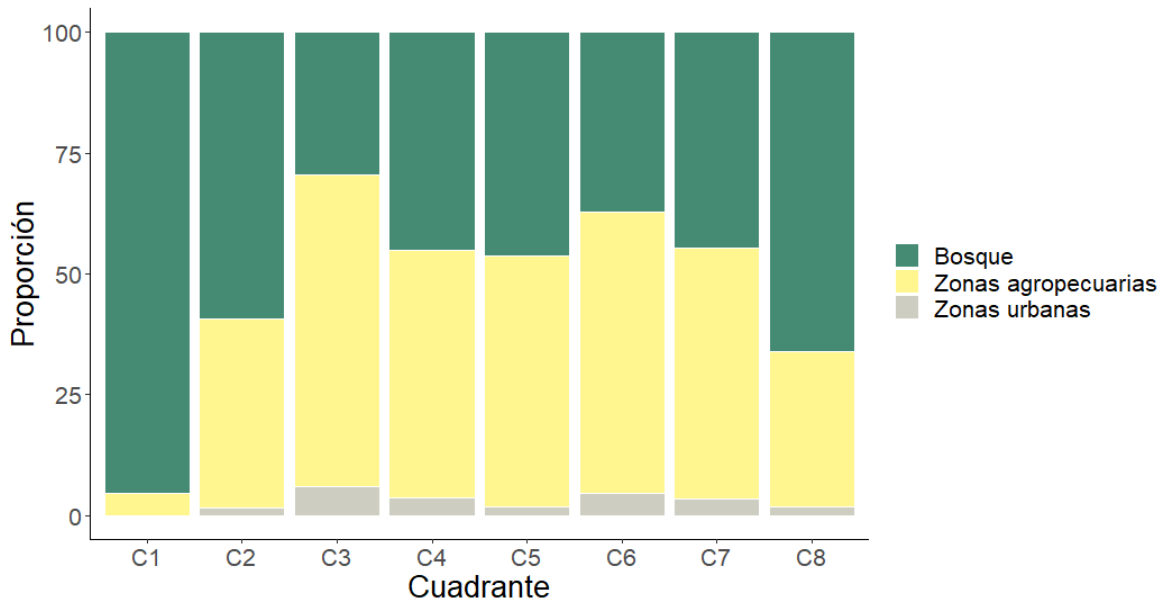


Figura 14. Proporción de coberturas por cuadrante.

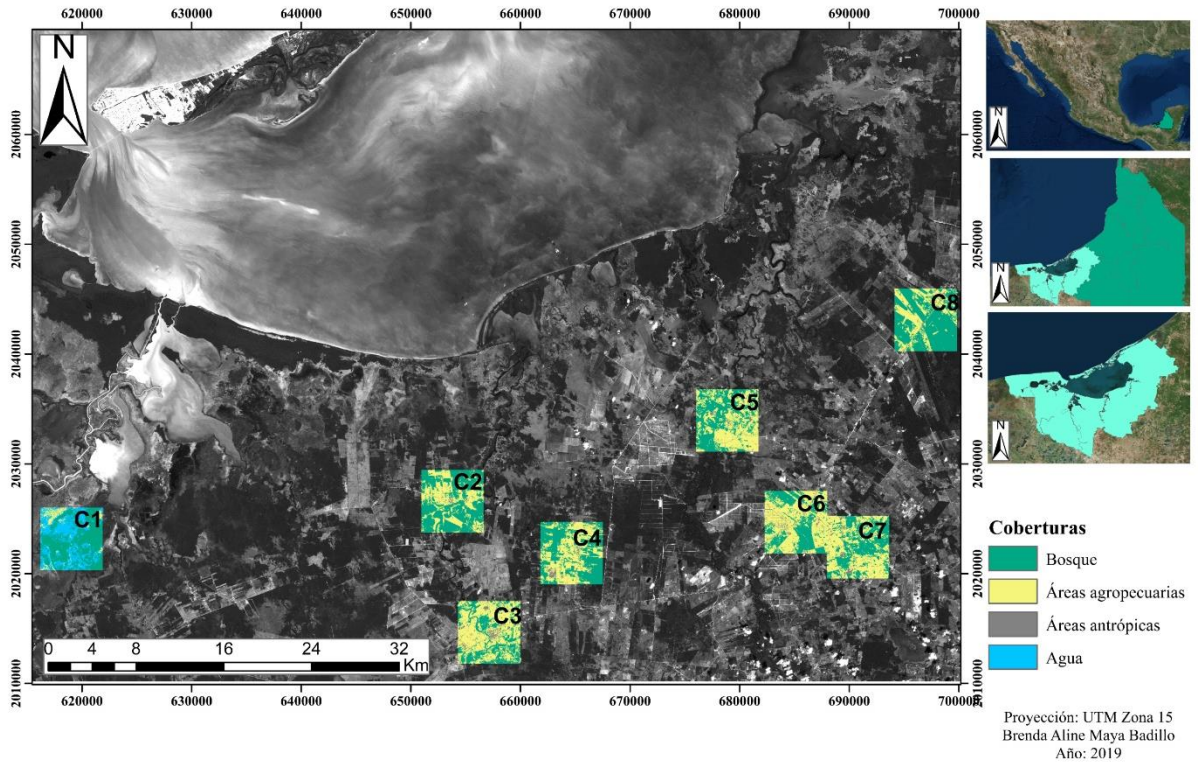
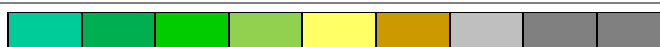


Figura 15. Área de estudio y unidades de análisis (UA) también llamadas cuadrantes (C1 a C7).

Cuadro 8. Valores del INRA. La escala de colores va desde verde a gris, donde verde representa el valor mayormente conservado o con menor índice de antropización y el color gris representa el valor con mayor índice de antropización, los colores amarillos representan valores de antropización intermedios.

Cuadrante	A (0)	B (0.5)	C (1)	INRA
C1	243392	11792	0	2.31
C2	151662	99926	3596	20.98
C3	75261	164780	15143	38.22
C4	115045	131208	8931	29.20
C5	118347	132092	4745	27.74
C6	94693	148857	11637	33.72
C7	113987	132445	8752	29.38
C8	168665	81828	4217	17.68



Análisis de datos

- *Áreas de amortiguamiento*

Las áreas de amortiguamiento en promedio fueron de 0.11 a 3.92 km lineales para hembras y machos, respectivamente. Lo que equivale a un área de dispersión que va de 0.03 a 48.27 km² (Figura 16). De igual manera se obtuvieron las áreas de amortiguamiento para machos positivos al virus de influenza con un intervalo de 1.39 km a 3.92 km lineales, lo que equivale a 6.07 a 48.27 km² (Figura 17). En el caso de las hembras positivas al virus de influenza se obtuvieron áreas de amortiguamiento de 0.11 km a 1.69 km lineales, lo que equivalen a 0.03 a 8.97 km² (Figura 18).

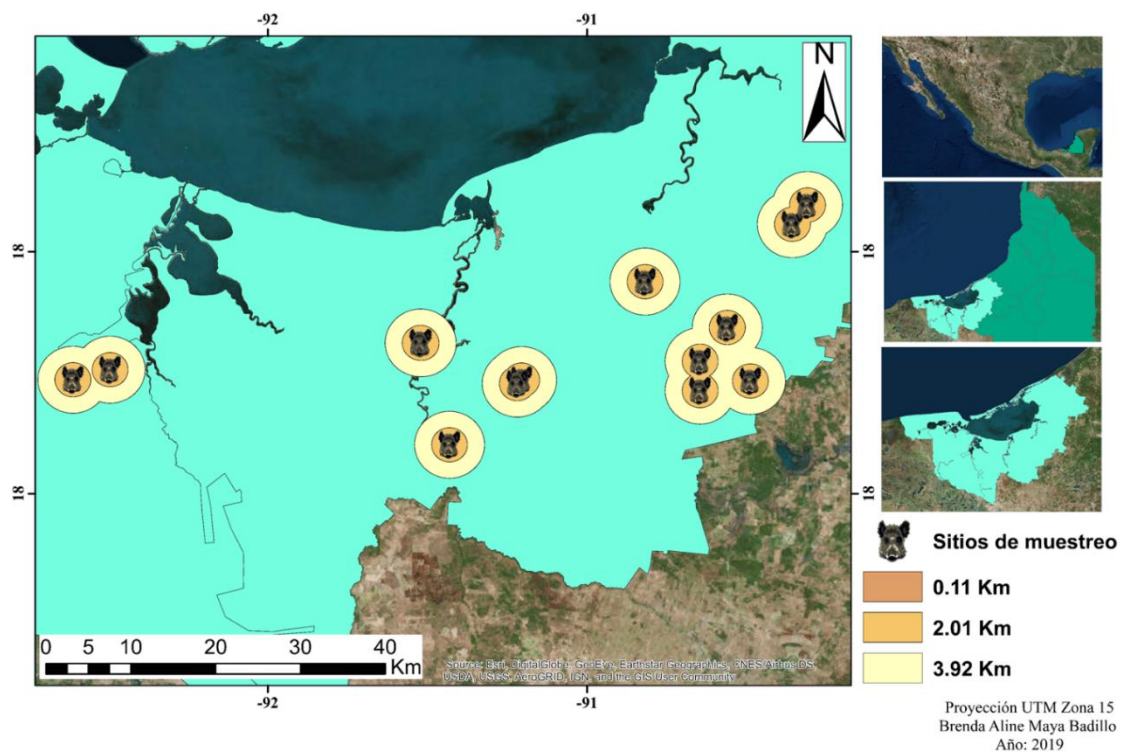


Figura 16. Sitios de muestreo con áreas de amortiguamiento para cerdos asilvestrados (hembras y machos) que va en un rango de 0.11 km hasta 3.92 km de ámbito hogareño.

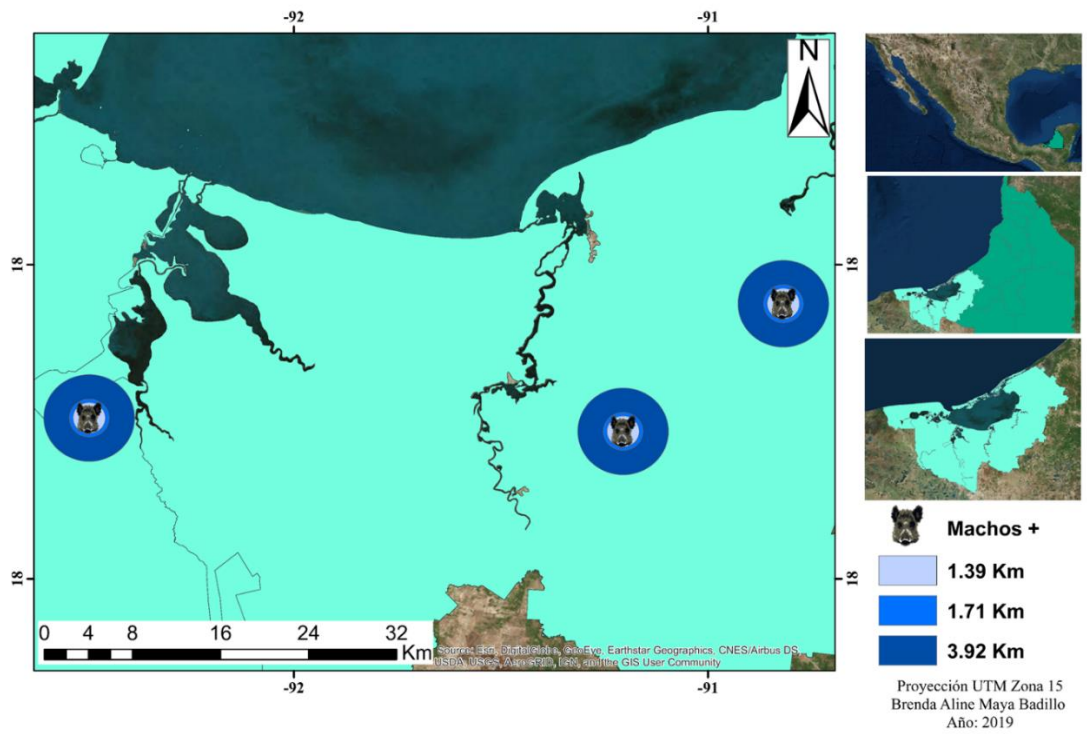


Figura 17. Sitios de muestreo con áreas de amortiguamiento de machos de cerdos asilvestrados positivos a virus de influenza A por serología y/o RT-PCR que va en un rango de 1.39 km hasta 3.92 km de ámbito hogareño.

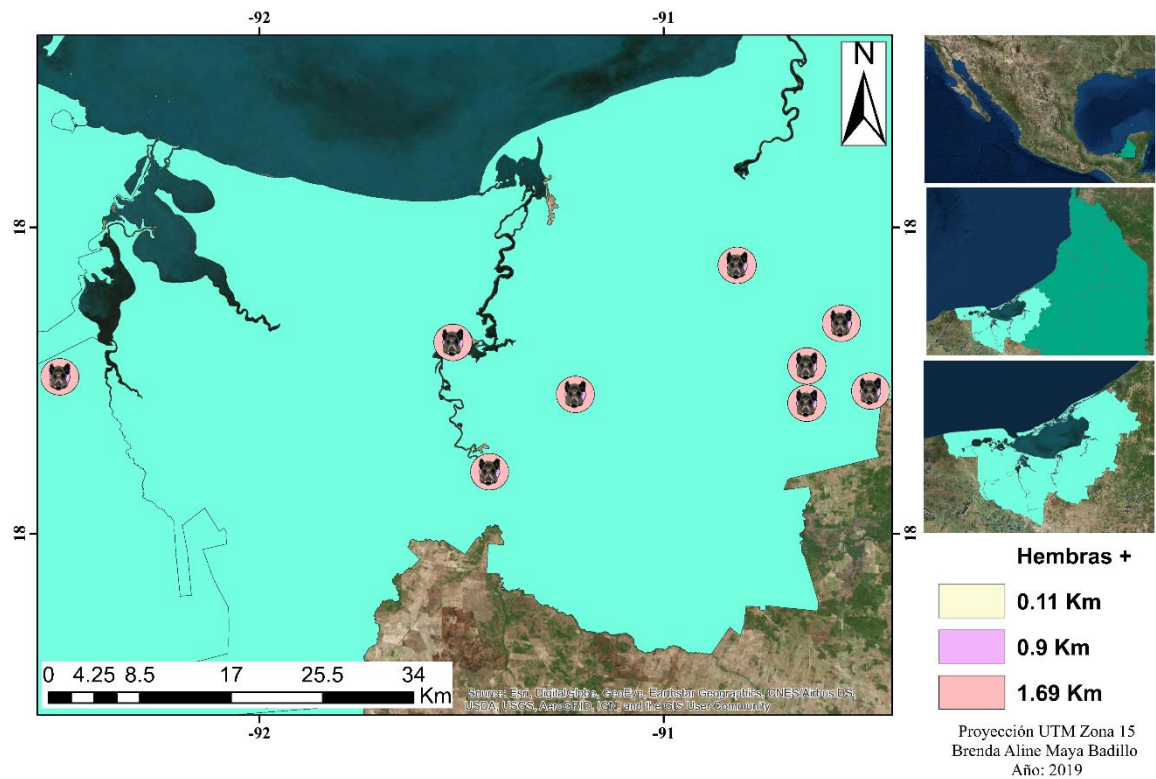


Figura 18. Sitios de muestreo con áreas de amortiguamiento de hembras de cerdos asilvestrados positivos a virus de influenza A por serología y/o RT-PCR que va en un rango de 0.11 km hasta 1.69 km de ámbito hogareño.

- *Análisis estadístico*
 - *Modelo de regresión logística*

Cuando la variable respuesta fue seropositividad y la variable explicativa fue INRA, se encontró evidencia estadística para concluir que existe un efecto de la antropización del paisaje en la seropositividad, con un valor marginalmente significativo de $p = 0.0576$. Se utilizó un alfa de 0.05 (Figura 19).

El resto de las variables tuvo un comportamiento diferente al anterior.

- *Ji cuadrada (χ^2)*

En las variables edad y qRT-PCR se rechazó la hipótesis nula de independencia de variables, por lo tanto, existe evidencia estadística para concluir que estas variables son dependientes, con un valor de $p = 0.05$, utilizando un valor de alfa de 0.05.

Para el resto de las variables no se rechazó la H_0 .

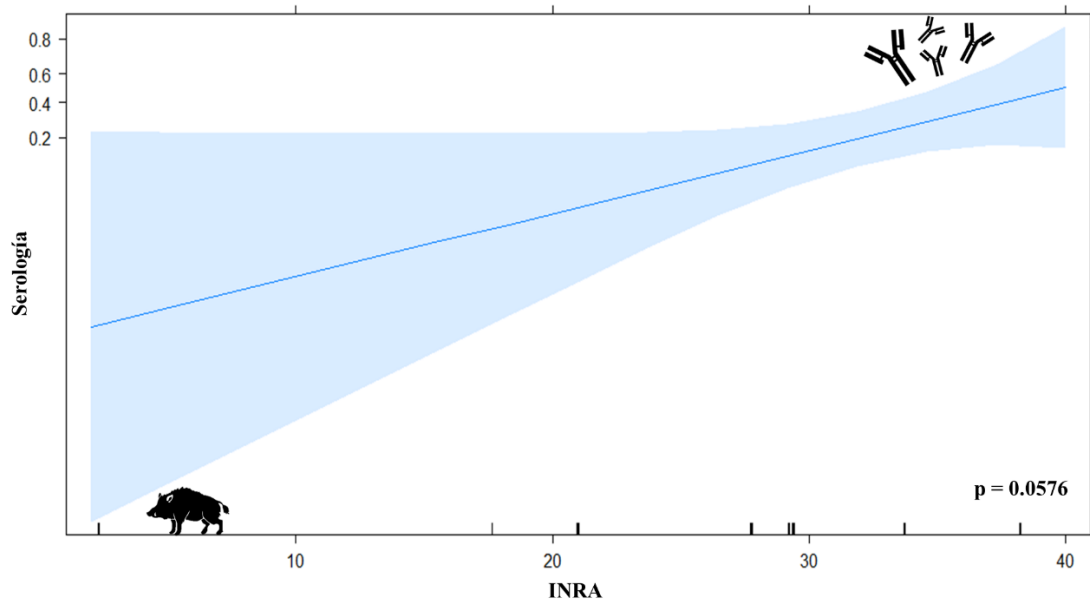


Figura 19. Modelo de regresión logística. En el gráfico podemos observar en el eje de las X el “INRA” y en el eje de las Y la variable respuesta “Serología”. Se presenta un incremento en la probabilidad de que un individuo resulte positivo a la serología cuando el INRA aumenta. Además, se aprecia un intervalo de confianza que es representado por la banda azul claro, demasiado abierto al inicio que tiende a disminuir conforme el INRA aumenta, este comportamiento en el intervalo de confianza este asociado al tamaño de muestra.

DISCUSIÓN

La eco-epidemiología de enfermedades zoonóticas multi-hospedero emergentes y reemergentes, como influenza A, son poco consideradas dentro del sistema de vigilancia epidemiológica en México. Existen pocos estudios que investigan la posibilidad de transmisión inter-especie ya que se enfocan de manera aislada en la presencia del agente infeccioso en los principales hospederos y de manera particular en hospederos domésticos. Son aún menos, los estudios que engloban el nexo que existe entre la emergencia de enfermedades virales con respecto a los cambios antropogénicos como la antropización del paisaje y en menor proporción la incorporación de especies exóticas invasoras en la ecología de un virus de tanta importancia para la salud pública y salud animal como lo es el virus de influenza A. Por lo anterior, en este proyecto, se estudió el papel del cerdo asilvestrado (*Sus scrofa*) en la transmisión y mantenimiento de virus de influenza A, debido a que es una especie exótica invasora, generalista de hábitat que interactúa con animales silvestres, domésticos y seres humanos y que además se adapta a distintos tipos de ambientes conservados y ambientes con diferente grado de antropización, facilitando la diversificación de virus de influenza A.

En este estudio se demostró la exposición que tienen los cerdos asilvestrados a los virus de influenza A de origen porcino, aviar y principalmente humano. Se detectaron títulos de anticuerpos que van desde 80 UHA hasta 2560 UHA, para los subtipos H1N1 humano, H1N1 porcino y H5N2 aviar.

En un estudio realizado durante el periodo de 2010 a 2013, se obtuvieron muestras de suero de cerdos asilvestrados en 35 estados de EE. UU. Se analizaron contra 45 variantes

antigénicas contemporáneas de virus de influenza A aviar, porcina y humana; de los cuales, el 4.9 % fueron seropositivos a virus de influenza A (Martin *et al.*, 2017). En otro estudio realizado en la Reserva de la Biósfera Sierra la Laguna, localizada en Baja California Sur, México, donde se buscó detectar la presencia de anticuerpos contra enfermedades bacterianas y virales en cerdos asilvestrados, obtuvieron un valor de seroprevalencia de 30.7% de dos variantes antigénicas, el H1N1 porcino y el H3N2 porcino (Pérez-Rivera *et al.*, 2017). En nuestro estudio la seroprevalencia estimada fue del 14.75%, mayor en comparación con el primer estudio mencionado, pero menor con respecto al segundo estudio. Esta diferencia en la seroprevalencia reportada en diferentes investigaciones con respecto a la del presente estudio, sugiere que existen factores que favorecen el aumento o disminución de la prevalencia serológica que pueden ir desde época del año, características del ambiente en general y del hospedero, así como la interacción que tiene con otros hospederos y la capacidad de los antígenos utilizados para realizar la prueba serológica para detectar la exposición del cerdo asilvestrado a los virus de influenza A circulantes (Pedersen *et al.*, 2017).

En el trabajo realizado por Martin y colaboradores (2017) también se detectaron individuos doblemente seropositivos para diferentes virus porcinos, para diferentes virus aviares y para virus aviares y porcinos, lo que indica que los cerdos asilvestrados estuvieron expuestos a virus de influenza A tanto porcinos como aviares. En nuestro estudio, además, encontramos cerdos asilvestrados doblemente seropositivos para el subtipo H1N1 humano y el subtipo H1N1 porcino. Esto sugiere que los cerdos asilvestrados podrían estar expuestos a la infección de subtipos de influenza A de diferentes orígenes, generando nuevas variantes de

virus de influenza A de preocupación en salud animal y salud pública (Cheung y Poon, 2007; Martin *et al.*, 2017; Short *et al.*, 2015).

Uno de los orígenes virales de mayor preocupación a los que los cerdos asilvestrados están expuestos, es el humano, con la última pandemia de 2009, se puso de manifiesto la interacción existente entre los hospederos humanos y porcinos, sin embargo, en pocas ocasiones es aclarado que la transmisión de virus de influenza de humanos a cerdos es mucho más frecuente que la zoonosis porcina y humana, y es fundamental en la diversidad viral encontrada en los hospederos porcinos (Nelson y Vincent, 2014). La escala de transmisión global de humanos a cerdos representa la mayor zoonosis inversa o también llamada antropozoonosis, de un agente infeccioso documentado hasta el momento, por lo que, el sesgo hacia la percepción de los cerdos como fuentes de virus humanos, en lugar de hospederos susceptibles, es clave para la comprensión de la naturaleza bidireccional de la interfaz humano-animal y como esta interacción produce amenazas de influenza para los diferentes hospederos (Hassell *et al.*, 2017; Nelson, 2016). En nuestro estudio, encontramos títulos para el subtipo H1N1 humano de hasta 2560 UHA, lo que demuestra la exposición e infección al virus de influenza humana. Esta interacción entre los cerdos asilvestrados y los humanos de la región de Laguna de Términos pone de manifiesto la zoonosis y antroposis que está existiendo en este sistema y además demuestra que los cerdos asilvestrados no solo fungen como transmisores de virus de influenza A, sino sugiere que pueden estar expuestos, infectarse y enfermarse, al menos con subtipos de origen humano.

La exposición de los humanos a los virus de influenza A y transmisión de estos, se ve favorecida por la cacería y captura de los cerdos asilvestrados, o a través de los perros utilizados para la caza (Pedersen *et al.*, 2018). Las actividades humanas están favoreciendo

la sinantropía de los cerdos asilvestrados, además cada vez hay más pruebas de la traslocación que realizan los humanos de los cerdos asilvestrados (Spencer y Hamoton, 2005), para establecer nuevas oportunidades de caza o producciones de traspatio, sin embargo, las medidas de bioseguridad no son las adecuadas y por las características físicas y evolutivas de estos animales, terminan escapando, estableciéndose en muchas ocasiones en nuevas áreas e interactuando de nuevo con hospederos silvestres, domésticos y humanos, pero tras el riesgo de haber estado expuestos a agentes infecciosos humanos y de animales domésticos como el virus de influenza (Goedbloed *et al.*, 2013; Hernández *et al.*, 2018; Tabak *et al.*, 2017). Los cerdos asilvestrados de nuestro estudio mostraron exposición al subtipo H1N1 porcino con títulos de anticuerpos de 80 a 320 UHA y al subtipo H5N2 aviar con título de 80 UHA, estos títulos son bajos en comparación con el subtipo humano, sin embargo, la interacción con estos subtipos virales se presentó y respalda el comportamiento sinantrópico de los cerdos asilvestrados en sistemas con altos niveles de transformación de uso de suelo como lo es la región de Laguna de Términos.

La comprensión del papel ecológico de los cerdos asilvestrados en la ecología de los virus de influenza A ha sido limitada debido a que la vigilancia epidemiológica realizada en otros países a menudo es por anticuerpos (serovigilancia) en lugar de la detección directa de los virus de influenza A, como en humanos y especies domésticas como lo cerdos y las aves (Sun *et al.*, 2015; Pepin *et al.*, 2019). En este sentido, nuestro estudio complementa los hallazgos obtenidos en serología con la detección molecular del virus de influenza, donde se obtuvo una prevalencia de 19.67% de cerdos positivos al virus de influenza A, mayor a la obtenida en un estudio realizado en 2014 en la Reserva Regional de Innamincka, Australia, donde obtuvieron una prevalencia de 13.04% de cerdos asilvestrados positivos al virus de influenza

(Dalziel, Peck, Hurt, Cooke y Cassey, 2016). Dalziel y colaboradores (2016) hacen referencia de que, a pesar de su prevalencia baja, es de suma importancia implementar sistemas de vigilancia epidemiológica por las posibles repercusiones biológicas que tienen los cerdos asilvestrados.

En nuestro estudio, el mayor número de muestras positivas molecularmente fueron de hisopos nasales, con una prevalencia de 13.11 %, lo que comprueba la excreción viral en cerdos asilvestrados, además se obtuvo el 4.91 % de prevalencia de animales positivos de muestras de tráquea y el 1.63 % de muestras de pulmón, confirmando la susceptibilidad de las células del tracto respiratorio, tanto en vías altas como en vías respiratorias bajas. En este sentido, dado que las características fisiológicas de los cerdos asilvestrados están ligadas directamente a la especie del cerdo doméstico, se esperaría que la distribución de sus receptores celulares en el aparato respiratorio coincidiera con los descritos para la interacción entre virus de influenza A con los receptores celulares Saa2,3-Gal y Saa2,6-Gal en el cerdo doméstico.

Los cerdos domésticos poseen una distribución de manera homogénea de receptores celulares Saa2,3-Gal y Saa2,6-Gal, lo cual ha colocado al cerdo como un hospedero susceptible a la infección por virus aviares y humanos por el potencial amplificador, también llamado mezclador al ser infectados por virus de diferente origen (Graaf y Fouchier, 2014). Los resultados del presente estudio sugieren entonces, que la distribución de los receptores celulares de los cerdos asilvestrados es similar a la de los cerdos domésticos debido a las muestras positivas a la qRT-PCR de tráquea y pulmón. Sin embargo, cabe mencionar que ningún individuo se mostraba aparentemente enfermo, por lo que la susceptibilidad y

permisibilidad de las células de estos animales en respuesta a una infección viral comparada con la de cerdos domésticos podría ser distinta.

Las respuestas ante infecciones virales están mediadas por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad de tipo I (MHC-I), un conjunto de genes que inducen la respuesta inmune presentando el antígeno a los linfocitos T (Macdonald *et al.*, 2010; Moutou *et al.*, 2013). En un estudio de 2017 compararon el polimorfismo y especificidades de unión a péptidos de moléculas de clase I del MHC-I porcino para observar si existían diferencias entre la respuesta que tiene el MHC-I de los jabalíes tibetanos ante el virus de influenza A con respecto a la respuesta que tiene el MHC-I de los cerdos domésticos de la raza Heishan. Inesperadamente encontraron que no existía divergencia y que los sitios de alta variación podrían determinar sus características de unión a péptidos (Fan *et al.*, 2017). Fan y colaboradores (2017) asumieron que la selección artificial de las razas de los cerdos podría proporcionar una mayor presión para generar diversidad genética y polimorfismo de MHC-I que la selección natural. Sin embargo, en otros estudios, hacen referencia sobre la variabilidad del MHC-I y como esta se mantiene mediante la selección dirigida por el agente infeccioso, donde la diversidad genética es particularmente importante en animales silvestres (Sommer, 2005). Por lo anterior, no podemos asumir que los cerdos asilvestrados de nuestro estudio tengan una respuesta inmune distinta a la que se esperaría en los cerdos domésticos frente al virus de influenza A, tendríamos que realizar un análisis genético para observar diferencias en cuanto al polimorfismo del MHC-I y su respuesta ante la infección por el virus de influenza. Sin embargo, si podemos inferir en que el comportamiento de los animales positivos a la qRT-PCR en cuanto a la semiología clínica fue distinto en comparación con la semiología provocada por el virus de influenza A observada en los cerdos domésticos.

Otro hallazgo que se encontró fue que existía evidencia estadística entre la dependencia de las variables edad y qRT-PCR, esta relación está dada por los adultos que son los individuos que fueron mayormente positivos a la prueba, por lo que podemos asumir estos resultados como parte de la respuesta inmune innata que transfieren las hembras a sus lechones al momento de nacer, por lo que estos individuos de corta edad se encontraban protegidos inmunológicamente ante los virus circulantes. En un estudio realizado en 2013, exploraron la relación entre el sistema inmune innato y la resistencia viral en jabatos (lechones de jabalí) y encontraron que la actividad del complemento dependía de los niveles de anticuerpos naturales, maternos y la condición corporal de los lechones, proporcionando evidencia que vincula a la inmunidad innata con la aptitud individual dentro de una población de mamíferos silvestres (Rossi *et al*, 2013).

Además de la posible aptitud inmunológica de los lechones, otro factor que puede estar explicando esta relación entre la edad adulta y los resultados positivos a la qRT-PCR es el amplio ámbito hogareño que tienen los adultos, específicamente los machos, lo que les permite recorrer amplias distancias y favorecer la tasa de contacto con otros hospederos del virus de influenza A. Las áreas de amortiguamiento creadas a partir del rango de ámbito hogareño general para hembras y machos, demuestra la coincidencia espacial de los individuos que a su vez podrían interactuar con otros hospederos de diferentes ambientes. De manera particular uno de los cerdos asilvestrados, macho, adulto, positivo a la qRT-PCR, también resultó positivo a la serología, con un título de 80 UHA para el subtipo H5N2 y coincidió con la muestra que se pudo aislar en embrión de pollo. Estos resultados sugieren tener una relación con las características propias del individuo, como lo es su ámbito hogareño, que le permite recorrer grandes distancias y a su vez, tener contacto con distintos

hospederos de influenza A. En algunos estudios se ha observado que las hembras tienen un ámbito hogareño de 0.3 a $7.2 \pm 1.8 \text{ km}^2$ y en el caso de los machos el ámbito hogareño va de 3.1 a $48.3 \pm 4.3 \text{ km}^2$, sin embargo, la dispersión dependerá de una serie de factores como el lugar, la región geográfica, la disponibilidad de alimento y agua, la temporada del año, la etapa fisiológica en la que se encuentren y la densidad local de cerdos asilvestrados (Wehr *et al.*, 2017; Mayer, 2009; Mcilroy, 1990; Hampton, 2004; Salbosa, 2009).

Uno de los principales efectos negativos asociados al amplio rango de distribución de los cerdos asilvestrados es la posible interacción con hospederos de fauna silvestre, doméstica y humanos, debido a la transmisión de agentes infecciosos causantes de enfermedad, lo cual se asocia directamente con la transformación de los ecosistemas a agroecosistemas y ecosistemas urbanos (Wehr *et al.*, 2017; Song *et al.*, 2018). En nuestro estudio, a través de la secuenciación y el análisis filogenético, se identificó el cruce de barrera entre especies, de ave a cerdo asilvestrado al obtener la secuencia del virus “Feral swine/Campeche/DMZC-DEFSAL-UIFMVZ19-12 (H5N2)”, la cual se transfirió de un hospedero a otro de manera intacta. Lo que pone de manifiesto la posible interacción que tienen los cerdos asilvestrados con hospederos de fauna silvestre, doméstica, humanos y/o fuentes de infección.

En 2008, en Corea, fueron aislados dos virus de influenza H5N2 aviar de cerdos domésticos. La secuenciación y el análisis filogenético de las proteínas determinaron que el virus aislado “Sw/Korea/C12/08 (H5N2)” correspondía a un virus completamente aviar, que provenía de aves silvestres (Lee *et al.*, 2009) al igual que el virus H5N2 reportado en nuestro estudio, donde se observó que los 8 segmentos del virus tenían un origen completamente aviar. Sin embargo, en nuestro análisis, el virus H5N2 se localizó en un grupo de virus de influenza H5N2 originados en aves domésticas, específicamente pollo de engorda, estos virus fueron

aislados y caracterizados en México durante 1994 y 1995, lo cual coincide con varios brotes de influenza H5N2 aviar de baja patogenicidad en 1994 que posteriormente mutaron a un virus de alta patogenicidad en 1995 (Villarreal-Chávez *et al.*, 2003).

Además de los virus aviares, dentro del grupo de virus de influenza donde se localizó el virus aislado en nuestro estudio, se encuentran dos virus H5N2 de origen aviar (pollo de engorda) pero aislados en cerdos domésticos, el GtoDMZC02 (H1N1) y el EdoMexDMZC03 (H5N2), aislados y caracterizados en 2014 y 2015 respectivamente (Saavedra-Montañez *et al.*, 2018). En el estudio de Saavedra y colaboradores (2018) hacen mención sobre el posible origen de estos virus que al igual que en nuestro análisis, el genoma de estas variantes se mantuvo con un origen completamente aviar a pesar del nuevo hospedero que infectaban. También ponen de manifiesto la posible interacción que existe entre sistemas de producción mixtos, donde especies como aves y cerdos están en contacto, lo que podría dar una explicación válida del salto taxonómico del virus H5N2 aviar.

En México, así como en varias partes del mundo, existe un panorama favorable para la transmisión de virus de influenza A, desde la transmisión de aves silvestres a animales domésticos (aves, cerdos, perros, caballos, etc.) y humanos, al igual que la transmisión de aves domésticas al resto de animales domésticos, humanos y en algunos casos animales silvestres. Uno de los escenarios más propicios es el de las producciones mixtas ya mencionado, donde dos especies o más comparten espacios físicos y por ende la tasa de contacto aumenta, favoreciendo la interfaz y transmisión de virus de influenza A (INEGI, 2007).

Los perros pueden desempeñar un papel en la transmisión y propagación entre especies de virus de influenza H5N2. En 2013 se describió un nuevo virus reordenado de cerdo y ave

H5N2 que infecto a perros (*Canis lupus familiaris*), sus resultados demostraron que el virus se propago entre individuos de la misma especie, los cuales mostraron signos respiratorios y seroconversión así como eliminación viral detectada en hisopos nasales, posteriormente se observaron manifestaciones clínicas respiratorias relacionadas con este virus en gatos y pollos (Guang-jian, Zong-shuai, Yan-li, Shi-jin, y Zhi-jing, 2012; Song *et al.*, 2013). Por lo que no podemos descartar la participación de los perros en la transmisión del virus H5N2, la tasa de contacto que esta especie mantiene con los cerdos asilvestrados y con distintos tipos de aves es muy alta debido al uso constante del perro en las labores de cacería, así como su presencia en las producciones agropecuarias.

Los cerdos asilvestrados interactúan con perros, aves, cerdos y más animales domésticos al igual que con humanos, animales silvestres y diferentes fuentes de infección, esta interacción esta explicada por el comportamiento sinantrópico de los cerdos asilvestrados, lo que favorece la transmisión de virus de influenza A entre los distintos tipos de hospederos ya mencionados. La emergencia de exposición e infección viral se ha asociado a cambios drásticos en los ecosistemas, como la deforestación, cambios de uso de suelo por actividades agropecuarias, entre otros (Reyes-Novelo, 2011). En el presente estudio encontramos evidencia marginalmente significativa de la relación entre la seropositividad y la antropización del paisaje, es decir, la probabilidad de que un cerdo asilvestrado se encuentre expuesto a virus de influenza A será mayor en ambientes con mayor grado de antropización del paisaje. En este sentido, la matriz del paisaje que predominaba en nuestros sitios de muestreo fueron zonas agropecuarias, dominadas por pastizales y ganadería, pero principalmente por plantaciones de palma aceitera africana (*Elaeis guineensis*). Actualmente las plantaciones de palma de aceite representan un problema para los bosques tropicales, su

expansión ha provocado la pérdida de 2 millones de hectáreas de bosques a nivel mundial en 2000 -2010 (Ordway, Naylor, Nkongho, y Lambin, 2015), además de las repercusiones en la ecología de las comunidades y por ende de sus enfermedades.

Los niveles actuales de interacción humano-ecosistema, impulsados por una mayor invasión ambiental y cambio en el uso de la tierra (explotación de recursos naturales y prácticas agrícolas y pecuarias), así como efectos ambientales como el cambio climático, dan lugar a la alteración de los hábitats y cambios en el ensamblaje de especies y las tasas de contacto que promueven la aparición de enfermedades zoonóticas (Hassell *et al.*, 2017). En un estudio realizado en 2017 se midió el nexo entre la fragmentación de los bosques en África y los brotes de enfermedades por el virus del Ébola (EVD), se mostró que los brotes de EVD en humanos ocurrieron principalmente en focos de fragmentación forestal, donde los humanos tenían mayor interacción con los reservorios de la enfermedad, por lo que las tasas de contacto aumentaban y por ende los brotes en humanos (Rulli, Santini, Hayman y Odorico, 2017). Esto tiene relación con nuestro estudio, que, si bien es una aproximación que tendrá que ser complementada con un mayor número de muestras y diseño experimental específico, nos muestra el efecto de la antropización sobre la exposición de los cerdos asilvestrados al virus de influenza A en áreas con mayor transformación antropogénica, específicamente en áreas dedicadas a la agricultura y ganadería, áreas con fragmentación y transformación del paisaje.

La región de Laguna de Términos se encuentra expuesta a la actual deforestación por la presión que ejerce el crecimiento poblacional humano, que a su vez, se refleja en una mayor demanda de alimentos, por lo que la agricultura y la ganadería siguen expandiéndose principalmente en los trópicos (Barlow *et al.*, 2018; Kremen y Merenlender, 2018). La

antropización del paisaje en esta región lamentablemente tiene una tendencia a aumentar, por lo que, con base en nuestros resultados, el monitoreo del cerdo asilvestrado es necesario, ya que su participación en la eco-epidemiología del virus de influenza A se pone de manifiesto al estar expuesto a distintas fuentes de infección viral y a la potencial diversificación de variantes virales.

Finalmente, las especies invasoras continúan proliferando e impactando negativamente los ecosistemas a escala global. Si bien los impactos están bien documentados para muchos animales invasores, carecemos de herramientas para predecir la resistencia biótica y el éxito de la invasión. La invasión biológica es una de las principales causas de pérdida de biodiversidad a nivel mundial, especialmente en los ecosistemas insulares de todo el mundo (Cuthbert *et al.*, 2019). Para controlar eficazmente a las especies invasoras, es importante determinar cómo sobreviven y aumentan sus poblaciones en las áreas que invaden (Cuthbert *et al.*, 2019; Maeda *et al.*, 2019). Los cerdos asilvestrados son una de las especies con mayor capacidad de invasión de nuevas áreas por sus características biológicas y evolutivas. Con nuestro estudio además comprobamos su papel dentro de la ecología del virus de influenza A en la región de Laguna de Términos, Campeche. Sin embargo, los efectos negativos asociados a esta especie son consecuencia de las actividades humanas. Las especies son parte de la biodiversidad mundial y evolutivamente desarrollan mecanismos para seguir existiendo y adaptarse al medio que los rodea (Ricciardi *et al.*, 2017). Tal es el caso de los cerdos asilvestrados que a lo largo del tiempo, han sido trasladados e introducidos a ecosistemas que no forman parte de su distribución natural, por lo que las poblaciones se adaptan para seguir existiendo, en este sentido, los seres humanos debemos comprender que solo somos una especie más dentro de la diversidad de especies que existen en la Tierra y nuestra percepción

así como las decisiones que tomamos y el respeto por la vida y los ecosistemas debe cambiar drásticamente al igual que la percepción de la utilidad e importancia de la biología de la invasión que permitirá comprender el desajuste entre la urgencia de tratar un problema de cambio global y la poca preocupación, falta de conciencia y comprensión para obtener apoyo para la implementación de programas de control y manejo de especies invasoras, un reto más para la era que se vive en la actualidad (Courchamp *et al.*, 2017; Ricciardi *et al.*, 2017).

CONCLUSIONES

El presente trabajo sugiere que los cerdos asilvestrados de la región de Laguna de Términos, Campeche están participando en la exposición, transmisión, mantenimiento y posible diversificación de virus de influenza A.

Se detectaron títulos altos de anticuerpos contra el subtipo H1N1 humano de hasta 2560 UHA, así como títulos positivos para los subtipos H1N1 porcino y H5N2 aviar, lo que refleja directamente la tasa de contacto de los cerdos asilvestrados con hospederos domésticos y humanos, haciendo evidente el comportamiento sinantrópico de los cerdos asilvestrados. La secuenciación del subtipo H5N2 aviar, apoya aún más el contacto con hospederos domésticos como las aves y por ende la potencial diversificación de virus de influenza A.

Los animales adultos parecieran tener un papel clave en la ecología del virus de influenza en este sistema. Los rasgos de historia de vida de los cerdos asilvestrados les permiten recorrer grandes distancias, lo que aumenta la interacción con diversos hospederos silvestres, domésticos, humanos y fuentes de infección al encontrarse y compartir distintos nichos ecológicos.

La antropización del paisaje parece tener un efecto sobre la seroprevalencia de virus de influenza A. Es probable que al aumentar la antropización del paisaje exista mayor probabilidad de encontrar cerdos asilvestrados que estuvieron expuestos a variantes virales de influenza A.

Se necesitan estudios que incluyan aproximaciones con mayor número de animales y un diseño experimental específico para obtener conclusiones con mayor robustez acerca de la situación de esta especie exótica invasora y el efecto que tienen las actividades humanas

como la fragmentación y pérdida del hábitat derivadas de las actividades agropecuarias sobre la ecología de enfermedades, no solo influenza A.

Es importante la inclusión de trabajos integrales, así como interdisciplinarios para abordar investigaciones de este tipo, es decir, sistemas con alta complejidad, donde los tomadores de decisiones formen parte del proyecto para un mejor abordaje de las medidas de control epidemiológico, específicamente de enfermedades zoonóticas emergentes y reemergentes con un enfoque de Una Salud.

RECOMENDACIONES

1. Estudiar el comportamiento, así como las interacciones que tienen los cerdos asilvestrados entre individuos de la misma población, con otras especies y con el ambiente en general en la región de laguna de Términos y en otras partes de México donde también se ha reportado su existencia, esto con la finalidad de la correcta toma de decisiones con base en conocimiento sobre esta especie exótica invasora.
2. Monitorear los agentes infecciosos (entre ellos el virus de influenza A) encontrados en esta especie para conocer las interacciones biológicas que pueden ser claves en la dinámica de diversas enfermedades.
3. Integrar al cerdo asilvestrado en la ecología y epidemiología del virus de influenza A y reconocer su papel como animal sinantrópico por la importancia que esto denota en enfermedades multihospedero como lo es influenza A.
4. Establecer programas de educación y buenas prácticas de alimentación a la población humana de Laguna de Términos que caza y consume a los cerdos asilvestrados, para prevenir enfermedades transmitidas por mala higiene en el consumo de esta carne.

REFERENCIAS

- Adeola, A. C., Oluwole, O. O., Oladele, B. M., Olorunbounmi, T. O., Boladuro, B., Olaogun, S. C., Peng, M. S. (2017). Analysis of the genetic variation in mitochondrial DNA, Y - chromosome sequences, and MC1R sheds light on the ancestry of Nigerian indigenous pigs. *Genetics Selection Evolution*, 1–5. <https://doi.org/10.1186/s12711-017-0326-1>.
- Aguirre, M. A., Ponce, A., Laura, B., Cabrera, A., Campos, E., Manuel, S. C., Gutiérrez, E., Mendoza, L. L. (2009). Especies exóticas invasoras: impactos sobre las poblaciones de flora y fauna, los procesos ecológicos y la economía, *Capital natural de México • Vol. II: Estado de conservación y tendencias de cambio. II*, 277–318.
- Allan, B. F. y Ostfeld, R. S. (2003). Effect of Forest Fragmentation on Lyme Disease Risk. *Conservation Biology*, 17(1), 267–272. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2003.01260.x>.
- Álvarez-Romero, J. G., R. A. Medellín, A. Oliveras de Ita, H. Gómez de Silva y O. Sánchez. (2008). Animales exóticos en México: una amenaza para la biodiversidad. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, Instituto de Ecología, UNAM, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, México, D.F., 518 pp.
- Arbeláez, G., Calderón, D., Rincón, M., Lora, Á. y Mercado, M. (2008). Improvement of two diagnostics methods for detection of influenza swine virus. *Universitas Scientiarum*, 13(1), 65–74.
- Barasona J. A., Latham M. C., Acevedo P., Armenteros J. A., Latham A. D., Gortázar C., et al. Spatiotemporal interactions between wild boar and cattle: Implications for cross-

- species disease transmission. *Vet Res.* 2014;45:1-122. <http://dx.doi.org/10.1186/s13567-014-0122-7>.
- Barlow, Gardner, T. A., Hicks, C. C., Lennox, G. D., Berenguer, E., Castello, L., Ferreira, J., Graham, N. A. J. (2018). The future of hyperdiverse tropical ecosystems. *Nature research* <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0301-1>.
- Barrios-Garcia, M. N. y Ballari, S. A. (2012). Impact of wild boar (*Sus scrofa*) in its introduced and native range: A review. *Biological Invasions*, 14(11), 2283–2300. <https://doi.org/10.1007/s10530-012-0229-6>.
- Bedford, T., Gunasekaran, C. P., Hurt, A. C., Kelso, A., Klimov, A., Lewis, N. S., Li, X. y Mccauley, J. W. (2015). Viruses vary with antigenic drift. *Nature*, 523. <https://doi.org/10.1038/nature14460>.
- Bewick, V., Cheek, L., y Ball, J. (2005). Statistics review 14 : Logistic regression, 9(1). *Critical Care*. <https://doi.org/10.1186/cc3045>.
- Brown, I. H. (2000). The epidemiology and evolution of influenza viruses in pigs, *Veterinary Microbiology* 74 (2000) 29 - 46. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00164-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00164-4).
- Cappelle, J., Gaidet, N., Iverson, S.A. *et al.* Characterizing the interface between wild ducks and poultry to evaluate the potential of transmission of avian pathogens. *Int J Health Geogr* 10, 60 (2011) doi:10.1186/1476-072X-10-60.
- Catford, J. A. (2018). Tradeoffs can cause native extinctions. *Nature Communications*, 9:2131. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04491-3>.
- Cheung, T. K. W., y Poon, L. E. O. L. M. (2007). Biology of Influenza A Virus, *ANNALS of the New York Academy of Sciences* 25, 1–25. <https://doi.org/10.1196/annals.1408.001>.
- Choi, M. J., Torremorell, M., Bender, J. B., Smith, K., Boxrud, D., Ertl, J. R., Yang, M.,

- Suwannakarn, K., Her, J., Nguyen, J., Uyeki, T. M., Levine, M., Lindstrom, S., Katz, J. M., Jung M., Vetter, S., Wong, K. K., Sreevatsan, S., Lynfield, R., Live Animal Markets in Minnesota: A Potential Source for Emergence of Novel Influenza A Viruses and Interspecies Transmission. *Clinical Infectious Diseases*, Volume 61, Issue 9, 1 November 2015, Pages 1355–1362, <https://doi.org/10.1093/cid/civ618>.
- CONABIO. (2017). Análisis de riesgo rápido de *Sus scrofa*. Sistema de información sobre especies invasoras en México. *Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México, D.F.* Disponible en: <https://www.biodiversidad.gob.mx/especies/Invasoras/pdf/acuaticas-invasoras-cap05.pdf>. [Consultado en enero de 2019].
- Corlett, R. T. (2015). The Anthropocene concept in ecology and conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 30(1), 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.10.007>.
- Courchamp, F., Fournier, A., Bellard, C., Bertelsmeier, C., Bonnaud, E., Jeschke, J. M., y Russell, J. C. (2017). Invasion Biology: Specific Problems and Possible Solutions. *Trends in Ecology & Evolution*, 32(1), 13–22. doi:10.1016/j.tree.2016.11.001.
- Cristóbal, V., Méndez, A., Luis, J., Canche, P., Manuel, J. y Hernández, R. (2014). Diversity, estructure and richness indicators for the conservation of vegetation biodiversity in rural landscapes. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 17 (2014): 185 - 196. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93931761004>.
- Crutzen, P. J. (2002). Geology of mankind. *Nature*, 415(January), 2002. <https://doi.org/10.1038/415023a>.
- Cuthbert, R. N., Callaghan, A. y Dick, J. T. A. (2019). A novel metric reveals biotic resistance potential and informs predictions of invasion success. *Scientific Reports*, 1–11.

<https://doi.org/10.1038/s41598-019-51705-9>.

Dale, V. H. y Polasky, S. (2007). Measures of the effects of agricultural practices on ecosystem services, *Ecological Economics* 64, 2, 15. 286 -296 .
<https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2007.05.009>.

Dalziel, A. E., Peck, H. A., Hurt, A. C., Cooke, J. y Cassey, P. (2016). Short Communication Proposed Surveillance for Influenza A in Feral Pigs, *EcoHealth* 13: 410–414.
<https://doi.org/10.1007/s10393-016-1126-8>.

Del Castillo, C. E. y Gómez, A. F., (2010). Texto y Cuaderno de trabajo de Laboratorio de Virología. Cd. Mx., México: FMVZ-UNAM.

Despommier, D., Ellis, B. R. y Wilcox, B. A. (2006). The role of ecotones in emerging infectious diseases. *EcoHealth*, 3(4), 281–289. <https://doi.org/10.1007/s10393-006-0063-3>.

Diario Oficial de la Federación (2016). ACUERDO por el que se determina la Lista de las Especies Exóticas Invasoras para México. 07 de diciembre de 2016.
http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5464456&fecha=07/12/2016.

Dirzo Rodolfo, A. A. y L. J. C. (2009). Diversidad florística de las selvas húmedas en paisajes antropizados. *Investigación Ambiental*, 1, 17–22.
<https://www.uv.mx/personal/tcarmona/files/2010/08/Dirzo-et-al-2008.pdf>.

Ditchkoff, S. S. y West, B. C. (2007). Ecology and management of feral hogs. *Human-Wildlife Conflicts*, 1(2), 149–151.
<https://digitalcommons.unl.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=1089&context=hwi>.

Essey, M., D. Stallknecht, E., Himes, S. y Harris. 1983. Follow-up survey of feral swine for *Mycobacterium bovis* infection on the Hawaiian island of Molokai. *Proceedings of the*

United States Animal Health Association 87:589-595.

Fan, S., Wang, Y., Wang, S., Wang, X., Wu, Y. y Li, Z. (2017). Polymorphism and peptide-binding specificities of porcine major histocompatibility complex (MHC) class I molecules. *Molecular Immunology*, (February), 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2017.06.024>.

Fattebert, J., Baubet, E., Slotow, R. y Fischer, C. (2017). Landscape effects on wild boar home range size under contrasting harvest regimes in a human-dominated agro-ecosystem. *European Journal of Wildlife Research* 63: 32 <https://doi.org/10.1007/s10344-017-1090-9>.

Genovesi, P. y Shine, C. (2000) European strategy on invasive alien species. *Nature and environment*, 137. <https://www.cbd.int/doc/external/cop-09/bern-01-en.pdf>.

Giuffra, E., Kijas, J.M., Amarger, V., Carlborg, O., Jeon, J.T. y Andersson L. (2000). The Origin of the Domestic Pig : Independent Domestication and Subsequent Introgression. *Genetics Society of America* 154 (4): 1785 - 1791. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1461048/pdf/10747069.pdf>.

Goedbloed, D. J., Hooft, P. Van, Megens, H., Langenbeck, K., Lutz, W., Crooijmans, R. P. M. A. y Prins, H. H. T. (2013). Reintroductions and genetic introgression from domestic pigs have shaped the genetic population structure of Northwest European wild boar. *BMC Genetics*, 14(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-14-43>.

Gortázar, C., Ferroglio, E., Höfle, U., Frölich, K. y Vicente, J. (2007). Diseases shared between wildlife and livestock: A European perspective. *European Journal of Wildlife Research* 53:241. DOI 10.1007/s10344-007-0098-y.

Graaf, M. D. y Fouchier, R. A. M. (2014). Role of receptor binding specificity in influenza

- A virus transmission and pathogenesis, *The EMBO Journal* 33(8), 823–841.
<https://www.embopress.org/doi/10.1002/emboj.201387442>.
- Gramer, M.R. Defining swine influenza virus. *J Swine Health Prod.* 2005;13(3):157-160.
<http://www.aasv.org/shap.html>.
- Guang-jian, Z., Zong-shuai, L., Yan-li, Z., Shi-jin, J. y Zhi-jing, X. (2012). Genetic characterization of a novel influenza A virus H5N2 isolated from a dog in China. *Veterinary Microbiology*, 155(2–4), 409–416.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.08.017>.
- Hampton J., Pluske J. y Spencer P., (2004). A preliminary genetic study of the social biology of feral pigs in south-western Australia and the implications for management, *Wildlife Rinvestigación*, 31. 375–381. doi. 10.1071 / WR03099.
- Hassell, J. M., Begon, M., Ward, M. J. y Fèvre, E. M. (2017). Urbanization and Disease Emergence: Dynamics at the Wildlife–Livestock–Human Interface. *Trends in Ecology and Evolution*, 32(1), 55–67. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.09.012>.
- Hernández, Cortney, M. P., Herna, F. A., Smyser, T. J., Piaggio, A. J., Lance, S. L., Milleson, M. P. y Wisely, S. M. (2018). Invasion ecology of wild pigs (*Sus scrofa*) in Florida, USA: the role of humans in the expansion and colonization of an invasive wild ungulate. *Biological Invasions* 20: 7, 1865 - 1880 <https://doi.org/10.1007/s10530-018-1667-6>.
- Hidalgo-Mihart, M. G., Pérez-Hernández, D., Pérez-Solano, L. A., Contreras-Moreno, F., Angulo-Morales, J. y Hernández-Nava, J. (2014). Primer registro de una población de cerdos asilvestrados en el área de la Laguna de Términos, Campeche, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85(3), 990–994. <https://doi.org/10.7550/rmb.38520>.

- Hubálek, Z. (2003). Emerging human infectious diseases: Anthroponoses, zoonoses, and sapronoses [1]. *Emerging Infectious Diseases*, 9(3), 403–404. <https://doi.org/10.3201/eid0903.020208>.
- ICTV. (2018). Disponible en: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. [Consultado en noviembre de 2019].
- INEGI. (2007). Censo Agrícola, Ganadero y Forestal 2007. Disponible en: http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/proyectos/agro/ca2007/resultados_agricola/resultados_agricola/. [Consultado en agosto de 2019].
- Krammer, F., Smith, G.J.D., Fouchier, R.A.M. *et al.* Influenza. *Nat Rev Dis Primers* 4, 3 (2018) doi:10.1038/s41572-018-0002-y.
- Kremen, C., y Merenlender, A. M. (2018). Landscapes that work for biodiversity and people. *Science*, 362(6412). <https://doi.org/10.1126/science.aau6020>.
- Larson, G., Dobney, K., Albarella, U., Fang, M., Matisoo-Smith, E., Robins, J. y Cooper, A. (2005). Worldwide Phylogeography of Wild Boar Reveals Multiple Centers of Pig Domestication, *Science* 430(March), 1618–1622. DOI: 10.1126 / science.1106927.
- Lee, J. H., Pascua, P. N. Q., Song, M., Baek, Y. H., Kim, C., Choi, H. y Choi, Y. K. (2009). Isolation and Genetic Characterization of H5N2 Influenza Viruses from Pigs in Korea, *Journal of Virology* 83(9), 4205–4215. <https://doi.org/10.1128/JVI.02403-08>.
- Linnaeus, C. (1758). *Systema Naturae per Regna Tria Naturae, Secundum Classes, Ordines, Genera, Species, cum Characteribus, Differentiis, Synonymis, Locis*, 10(1), 1-824.
- Long, A. D., Baldwin-brown, J., Tao, Y., Cook, V. J., Balderrama-gutierrez, G., Corbett-detig, R. y Barbour, A. G. (2019). The genome of *Peromyscus leucopus*, natural host for Lyme disease and other emerging infections, *Science Advances* 5: 7 1–10. DOI:

10.1126 / sciadv.aaw6441.

- Long, J.S., Mistry, B., Haslam, S.M. *et al.* (2019) Host and viral determinants of influenza A virus species specificity. *Nat Rev Microbiol* 17, 67–81 DOI:10.1038/s41579-018-0115-z.
- Lowe, S., Browne, M., Boudjelas, S. y De Poorter, M. (2000). 100 of the world's worst invasive alien species. A selection from the Global Invasive Species Database. *The Invasive Species Specialist Group (ISSG) a Specialist Group of the Species Survival Commission (SSC) of the World Conservation Union (IUCN)*, 12. <https://doi.org/10.1614/WT-04-126.1>.
- Luskin, M. S., Brashares, J. S., Ickes, K., Sun, I., Fletcher, C., Wright, S. J. y Potts, M. D. (2017). Cross-boundary subsidy cascades from oil palm degrade distant tropical forests. *Nature Communications* 8: 2231. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01920-7>.
- Macdonald, I. K., Harkiolaki, M., Hunt, L., Connelley, T., Carroll, A. V., Machugh, N. D. y Ellis, S. A. (2010). MHC Class I Bound to an Immunodominant *Theileria parva* Epitope Demonstrates Unconventional Presentation to T Cell Receptors, *Plos Pathogens* 6(10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001149>.
- Machackova, M., L. Matlova, J. Lamka, J. Smolik, I. Melicharek, M. Hanzlikova, J. Docekal, Z. Cvetnic, G. Nagy, M. Lipiec, M. Ocepek y I. Pavlik. (2003). Wild boar (*Sus scrofa*) as a possible vector of mycobacterial infections: Review of literature and critical analysis of data from Central Europe between 1983 to 2001. *Veterinary Medicine* 48:51-65. DOI: 10.17221 / 5750-VETMED.
- Maeda, T., Nakashita, R., Shionosaki, K., Yamada, F. y Watari, Y. (2019). Predation on endangered species by human-subsidized domestic cats on Tokunoshima Island.

- Scientific Reports*, 10–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52472-3>.
- Martin, B. E., Sun, H., Carrel, M., Cunningham, F. L., Baroch, J. A., Hanson-dorr, K. C. y Smith, D. R. (2017). Feral Swine in the United States Have Been Exposed to both Avian and Swine Influenza A Viruses, *Applied and Environmental Microbiology* 83(19), 1–12. <https://doi.org/10.1128/AEM.01346-17>.
- Martínez, W. (2010). Estudio integrado del grado de antropización (INRA) a escala de paisaje: propuesta metodológica y evaluación. *INTROPICA*, 5, 45–54.
- Martínez-Dueñas, W.A. (2003). Diversidad y distribución horizontal de Calliphoridae (Insecta: Diptera) en un valle interandino con diferentes grados de antropización (Popayán - Colombia). Tesis de Pregrado, *Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación, Universidad del Cauca, Colombia*, 142.
- Mayer J.J., Nelson E.A. y Wike L.D., (2000). Selective depredation of planted hardwood seedlings by wild pigs in a wetland restoration area. *Ecol Eng* 15:S79–S85.
- Mayer J.J., y Brisbin L., (2009). Wild Pigs: Biology, damage, control techniques and management. *Savannah River National Laboratory Aiken, South Carolina* DOI: 10.2172 / 975099.
- Mc Cauley, J.W., Hongo, S. *et al.* (2012). Family orthomyxoviridae. In: AndrewMQK, Michael JA (eds) *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Academic Press, San Diego*.
- McIlroy, J. C. (1990). New techniques for an old problem - recent advances in feral pig control in Australia. *Management - Communication* 241–244.
- Meng, X., Lindsay, D. y Sriranganathan, N. 2009. Wild boars as sources for infectious

- diseases in livestock and humans. *Biological Sciences* 364:2697-2707. DOI: 10.1098 / rstb.2009.0086.
- Moutou, K., Koutsogiannouli, E., Stamatis, C., Billinis, C., Kalbe, C., Scandura, M., *et al.* (2013). Domestication does not narrow MHC diversity in *Sus scrofa*. *Immunogenetics* 65: 195–209. DOI: 10.1007 / s00251-012-0671-8.
- Muñoz-Medina, J. E., Sánchez-Vallejo, C.J., Méndez-Tenorio, A., Monroy-Muñoz, I. E., Angeles-Martínez, J., Coy-Arechavaleta, A. S. y Díaz-Quiñonez, J. A. (2015). In Silico Identification of Highly Conserved Epitopes of Influenza A H1N1, H2N2, H3N2 and H5N1 with Diagnostic and Vaccination Potential, 2015. *BioMed Research International* 2015, 813047, 12 p. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/813047>.
- Naranjo, V., C. Gortazar, M., Villar, J. y de la Fuente. (2007). Comparative genomics and proteomics to study tissue-specific response and function in natural *Mycobacterium bovis* infections. *Animal Health Research Reviews* 8:81-88. <https://doi.org/10.1017/S1466252307001260>.
- Nelson, M. I. y Vincent, A. L. (2014). Reverse zoonosis of influenza to swine: new perspectives on the human – animal interface. *Trends in Microbiology*, 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.12.002>.
- Nelson, V. (2016). Reverse zoonosis of influenza to swine: new perspectives on the human-animal interface. *Trends Microbiologic*, 23(3), 1922–2013. <https://doi.org/10.1080/10937404.2015.1051611>.INHALATION.
- Newbold, T., Hudson, L., Bennett, D. J., Choimes, A., Collen, B., Day, J., Palma, A. De, Di, S. y Mace, G. M. (2015). Global effects of land use on local terrestrial biodiversity. *Nature* 520, 45 - 50. <https://doi.org/10.1038/nature14324>.

- Nidaira, M., Taira, K., Itokazu, K., Kudaka, J., Nakamura M., Ohno, A. y Takasaki, T. (2007). Survey of the antibody against Japanese encephalitis virus in Ryukyu wild boars (*Sus scrofa riukiuanus*) in Okinawa, Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases* 60:309- 311. DOI: 10.1017 / S0950268813001611.
- Ong, A.K., Chen, M.I., Lin, L., Tan, A.S., Nwe, N.W., Barkham, T., *et al.* (2009) Improving the Clinical Diagnosis of Influenza—a Comparative Analysis of New Influenza A (H1N1) Cases. *PLoS ONE* 4 (12): e8453. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008453>.
- Ordway, E. M., Naylor, R. L., Nkongho, R. N. y Lambin, E. F. (2015). Oil palm expansion and deforestation in Southwest Cameroon associated with proliferation of informal mills. *Nature Communications*, (2019), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07915-2>.
- Owen, I. L., Gomez-Morales, M. A., Pezzotti, P. y Pozio, E. 2005. Trichinella infection in a hunting population of Papua New Guinea suggests an ancient relationship between Trichinella and human beings. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 99:618-624. DOI: 10.1016 / j.trstmh.2005.03.005.
- Palacios, G. *et al.* (2011) Human metapneumovirus infection in wild mountain gorillas, Rwanda. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 711–713. DOI: 10.3201 / eid1704.100883.
- Pandit, P. S., Doyle, M. M., Johnson, C. K., Smart, K. M., Young, C. C. W. y Drape, G. W. (2018). Predicting wildlife reservoirs and global vulnerability to zoonotic Flaviviruses. *Nature Communications*, (2018), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07896-2>.
- Patz, J. A., Daszak, P., Tabor, G. M., Aguirre, A. A., Pearl, M., Epstein, J. y Zakarov, V. (2004). Unhealthy landscapes: Policy recommendations on land use change and infectious disease emergence. *Environmental Health Perspectives*, 112(10), 1092–

1098. <https://doi.org/10.1289/ehp.6877>.
- Pedersen, K., Bauer, N. E., Rodgers, S., Bazan, L. R., Mesenbrink, B. T. y Gidlewski, T. (2017). Antibodies to various zoonotic pathogens detected in feral swine (*Sus scrofa*) at abattoirs in Texas, USA. *Journal of Food Protection*, 80(8), 1239–1242. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-17-016>.
- Pedersen, K., Turnage, C. T., Gaston, W. D., Arruda, P., Alls, S. A. y Gidlewski, T. (2018). Pseudorabies detected in hunting dogs in Alabama and Arkansas after close contact with feral swine (*Sus scrofa*), *BMC Vet Res* 14, 388 1–7. DOI: 10.1186 / s12917-018-1718-3.
- Pepin, K. M., Pedersen, K., Wan, X. F., Cunningham, F. L., Webb, C. T. y Wilber, M. Q. (2019) Individual-Level Antibody Dynamics Reveal Potential Drivers of Influenza A Seasonality in Wild Pig Populations. *Integrative and Comparative Biology*, Volume 59, Issue 5, November, Pages 1231–1242, <https://doi.org/10.1093/icb/icz118>.
- Pérez-Rivera, C.M., López, M.S., Arnaud, F.G. y Carreón, N.R. (2017). Detection of antibodies against pathogens in feral and domestic pigs (*Sus scrofa*) at the Sierra La Laguna Biosphere Reserve. *MexicoVeterinaria México OA* 4(1). DOI: 10.21753/vmoa.4.1.378.
- Rajao, D. S. y Vincent, A. L. (2015). Swine as a Model for In fl uenza A Virus Infection and Immunity, *ILAR Journal* 56(1), 44–52. <https://doi.org/10.1093/ilar/ilv002>.
- Ramos-Onsins, S. E., Manunza, A., Amills, M. *et al.* (2014). Mining the pig genome to investigate the domestication process, *Heredity* 113(6), 471–484. <https://doi.org/10.1038/hdy.2014.68>.
- Rejmanek, D., Hosseini, P. R., Mazet, J. A. K. y Daszak, P. (2015). Evolutionary Dynamics

- and Global Diversity of Influenza A Virus, 89(21), 10993–11001. *Journal of Virology* 89:10993–11001. <https://doi.org/10.1128/JVI.01573-15>.
- Reyes-Novelo, E., Ruíz-Piña, H., Escobedo-Ortegón, J., Rodríguez-Vivas, I., BolioGonzález, M., Polanco-Rodríguez, A. y Manrique-Saide, P. (2011). Situación actual y perspectivas para el estudio de las enfermedades zoonóticas emergentes, reemergentes y olvidadas en la Península de Yucatán, México. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 14: 1, 35 - 54. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93915703003>.
- Ricciardi, A., Blackburn, T. M., Carlton, J. T., Dick, J. T. A., Hulme, P. E., Iacarella, J. C., ... Aldridge, D. C. (2017). Invasion Science: A Horizon Scan of Emerging Challenges and Opportunities. *Trends in Ecology & Evolution*, 32(6), 464–474. DOI:10.1016/j.tree.2017.03.007.
- Rossi Eraud, C., Gilot, E. y Rossi, S. (2013). Innate Immunity Correlates with Host Fitness in Wild Boar (*Sus scrofa*) Exposed to Classical Swine Fever. *Plos One* 8(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079706>.
- Ruiz-Piña, H., Reyes-Novelo, E., Escobedo, F. y Pérez, M. (2013). Mamíferos sinantrópicos y la transmisión de enfermedades zoonóticas en el área rural de Yucatán. *Estudios multidisciplinarios de las enfermedades zoonóticas y ETVs en Yucatán - Universidad Autónoma de Yucatán*.740. E87, 183 - 194.
- Rulli, M. C., Santini, M., Hayman, D. T. S. y Odorico, P. D. (2017). The nexus between forest fragmentation in Africa and Ebola virus disease outbreaks. *Nature Publishing Group*, (February), 1–8. <https://doi.org/10.1038/srep41613>.
- Saavedra-Montañez, M., Vaca, L., Ramírez-Mendoza, H., Gaitán-Peredo, C., Bautista-Martínez, R., Segura-Velázquez, R. y Sánchez-Betancourt, J. I. (2018). Identification

- and genomic characterization of influenza viruses with different origin in Mexican pigs. *Transboundary and Emerging Diseases*, (April), 1–9. <https://doi.org/10.1111/tbed.12998>.
- Salbosa, Lasha-Lynn y Lepczyk. (2009). Movement in a Hawaiian Forest Ecosystem Using GPS Satellite Collars. *Nature Precedings* <http://dx.doi.org/10.1038/npre.2009.3903.1>.
- Short, K. R., Richard, M., Verhagen, J. H., Riel, D. Van, Schrauwen, E. J. A., Brand, J. M. A., Van Den y Herfst, S. (2015). One health, multiple challenges : The inter-species transmission of influenza A virus. *ONEHLT*, 1, 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2015.03.001>.
- Solís-Cámara, A. B., Arnaud-Franco, G., Álvarez, S., Galina-Tessaro, P. y José, J. (2009). Evaluación de la población de cerdos asilvestrados (*Sus scrofa*) y su impacto en la Reserva de la Biosfera Sierra La Laguna, Baja California Sur, México. *Tropical Conservation Science* 2(2), 173–188. <https://doi.org/10.1177/194008290900200205>.
- Sommer, S. (2005). The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. *Front Zool* 2, 16, 1–18. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-2-16>.
- Song, Q., qian, Zhang, F. xia, Liu, J. jun, Ling, Z. shuai, Zhu, Y. li, Jiang, S. jin, y Xie, Z. jing. (2013). Dog to dog transmission of a novel influenza virus (H5N2) isolated from a canine. *Veterinary Microbiology*, 161(3–4), 331–333. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.07.040>.
- Song, X., Hansen, M. C., Stephen, V., Peter, V., Tyukavina, A., Vermote, E. F. y Townshend, J. R. (2018). Global land change from 1982 to 2016. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0411-9>.

- Spencer, P. B. S., y J. O. Hampton. (2005). Illegal translocation and genetic structure of feral pigs in Western Australia. *Journal of Wildlife Management* 69:377–384. <https://www.jstor.org/stable/3803613>.
- Stephenson, I. y Nicholson, K. G. (2001). Influenza : vaccination and treatment. *European Respiratory* (3), 1282–1293. <https://erj.ersjournals.com/content/erj/17/6/1282.full.pdf>.
- Sun, H., Cunningham, F. L., Harris, J., Xu, Y., Long, L. P., Hanson-Dorr, K. y Wan, X. F. (2015). Dynamics of virus shedding and antibody responses in influenza A virus-infected feral swine. *Journal of General Virology*, 96(9), 2569–2578. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000225>.
- Suzán, G., Marcé, E., Giermakowski, T. J., Armién, B., Pascale, J., *et al.*, (2008). The Effect of Habitat Fragmentation and Species Diversity Loss on Hantavirus Prevalence in Panama. *ANNALS of the New York Academy of Sciences* 83, 80–83. <https://doi.org/10.1196/annals.1428.063>.
- Swayne, D., Perdue, M., Garcia, M., Rivera-Cruz, E., y Brugh, M. (1997). Pathogenicity and Diagnosis of H5N2 Mexican Avian Influenza Viruses in Chickens. *Avian Diseases*, 41(2), 335-346. doi:10.2307/1592187.
- Tabak M. A., Piaggio A. J., Miller R. S., Swetizer R. A. y Ernest H. B., (2017). Anthropogenic factors predict movement of an invasive species. *Ecosphere* 8(6) <https://doi.org/10.1002/ecs2.1844>.
- Tisdell, C. A., Oxford, S., York, N. y Paris, T. (2011). Wild Pigs : Environmental pest or economic resource?. *Pergamon Press / Elsevier*. DOI: 10.1016 / B978-0-08-024821-9.50001-9.
- Trilleras, J. M., Jaramillo, V. J., Vega, E. V y Balvanera, P. (2015). Agriculture , Ecosystems

- and Environment Effects of livestock management on the supply of ecosystem services in pastures in a tropical dry region of western Mexico. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 211, 133–144. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2015.06.011>.
- UICN. (2019). La Lista Roja de Especies Amenazadas de la UICN. Versión 2019-2 . <http://www.iucnredlist.org>. [Consultado en julio de 2019].
- Villarreal - Chávez, C. y Rivera - Cruz, E., (2003). An Update on Avian Influenza in Mexico. *Avian Diseases* 47(3): 1002 - 1005. 10.1637 / 0005-2086-47.s3.1002.
- Vries, R. P., De Vries, E., De Bosch, B. J., Groot, R. J. De, Rottier, P. J. M. y Haan, C. A. M. De. (2010). The influenza A virus hemagglutinin glycosylation state affects receptor-binding specificity. *Virology* 403, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.03.047>.
- Watarai, M., Ito, N., Omata, Y. y Ishiguro. N. (2006). A serological survey of *Brucella* spp. in free-ranging wild boar (*Sus scrofa leucomystax*) in Shikoku, Japan. *Journal of Veterinary Medical Science* 68:1139-1141. DOI: 10.1292 / jvms.68.1139.
- Wehr, N., Hessand, S. y Litton, C. (2017). Biology and Impacts of Pacific Island Invasive Species. 14. *Sus scrofa*, the Feral Pig (Artiodactyla: Suidae). *Pacific Science*, 72(2), 1–41. <https://doi.org/10.2984/72.2.1>.
- West, B. C., Cooper, A. L. y Armstrong, J. B. (2009). Managing wild pigs: A technical guide. *Human-Wildlife Interactions Monograph* 1:1–55. https://www.aphis.usda.gov/wildlife_damage/feral_swine/pdfs/managing-feralpigs.pdf.
- WHO. (2016). Vector - borne diseases. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs387/en/>. [Consultado en julio de 2019].
- Wyckoff, A. C., Henke, S. E., Campbell, T. A., Hewitt, D. G. y VerCauteren, K. C. (2009).

Feral Swine Contact With Domestic Swine: a Serologic Survey and Assessment of Potential for Disease Transmission. *Journal of Wildlife Diseases*, 45(2), 422–429. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-45.2.422>.

Zambon, M. C. (1999). Epidemiology and pathogenesis of influenza. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 3–9. https://doi.org/10.1093/jac/44.suppl_2.3.

ANEXOS



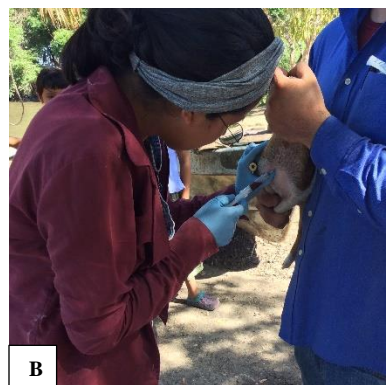
Anexo 1. Cazadores de cerdos asilvestrados ayudados en la cacería con sus perros. Se muestran las fotografías A y B, donde se observan a los cazadores y a sus perros utilizados para la cacería de cerdos asilvestrados, este es un método de caza muy utilizado en los municipios de Carmen y Palizada, Campeche.



Anexo 2. Rastros de cerdos asilvestrados dentro del APFFLT. Se muestran las fotografías A y B, en la primera se aprecia un rastro de huella de cerdo asilvestrados, mientras que en la segunda se aprecia un rastro de echadero de cerdo asilvestrado dentro del APFFLT.



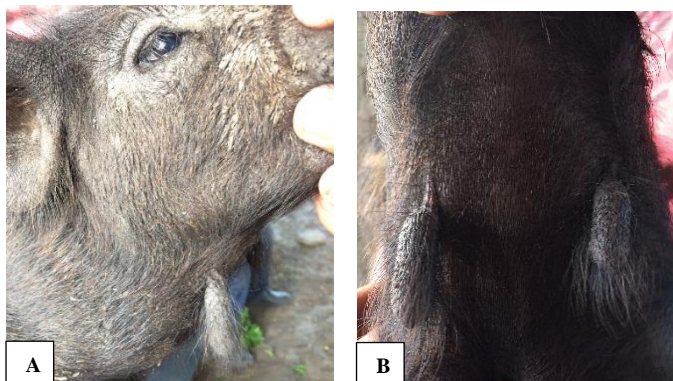
Anexo 3. Imágenes del paisaje de Laguna de Términos. Se muestran las fotografías de A - D para ejemplificar el paisaje del APFFLT, principalmente compuesto por manglares y popales.



Anexo 4. Toma de muestras biológicas de los cerdos asilvestrados. Se muestran las fotografías A y B para ejemplificar la toma de muestras biológicas en cerdos asilvestrados.



Anexo 5. Diferentes fenotipos de cerdos asilvestrados. Se muestran fotografías para ejemplificar los diferentes fenotipos encontrados en Laguna de Términos y zonas aledañas. La fotografía A muestra a una cerda asilvestrada lechón, la fotografía B a un macho juvenil, la fotografía C a un macho lechón y por último la fotografía D a un macho adulto.



Anexo 6. Presencia de mamellas en cerdos asilvestrados del APFFLT. Se muestran fotografías A y B para ejemplificar las mamellas, un vestigio antiguo que tenían estos dos lechones encontrados dentro del APFFLT.

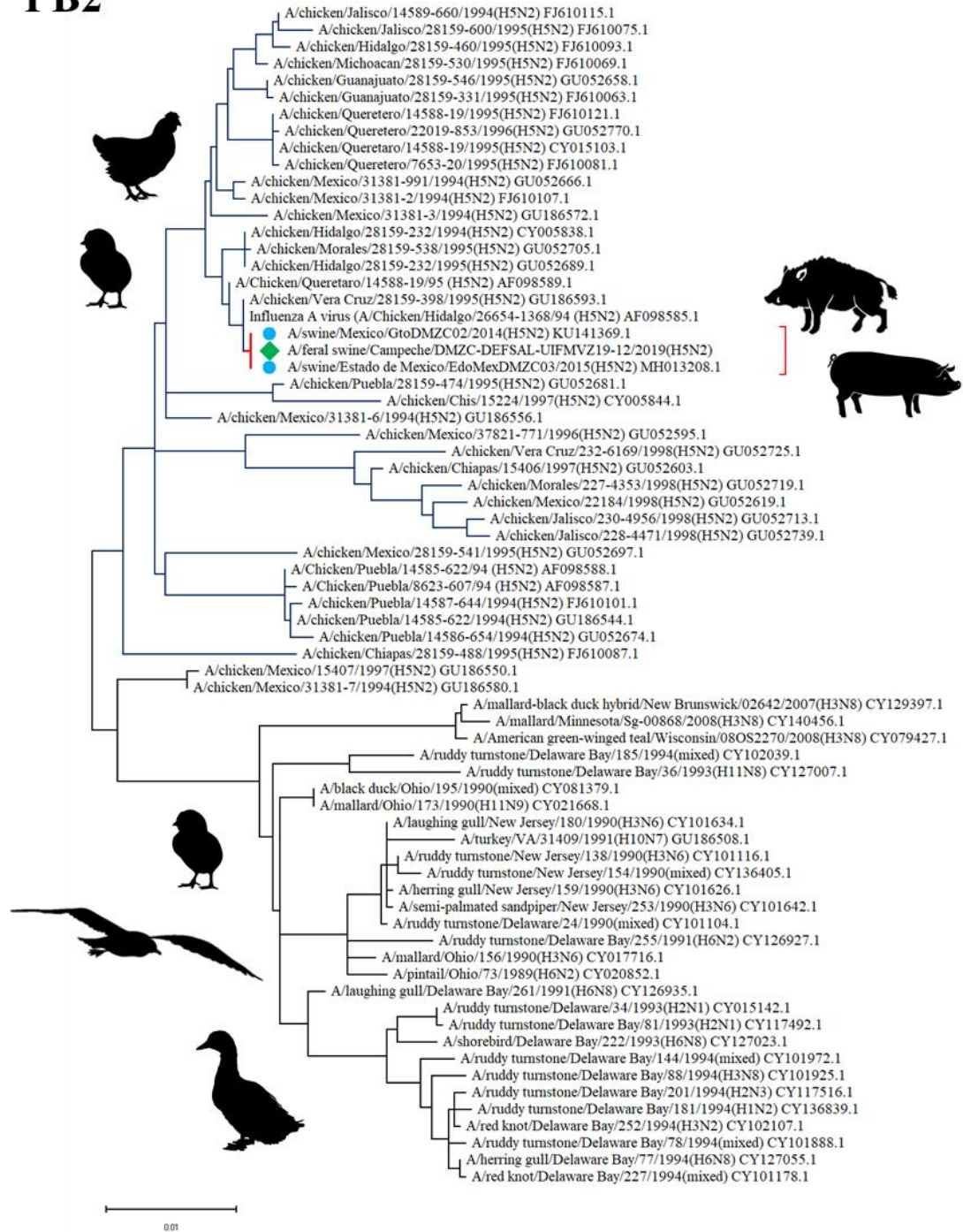
Anexo 7. Resultados de la comparación de medias entre el fenotipo de los cerdos asilvestrados del “Grupo 1” y “Grupo 2”. En la columna de Medidas morfométricas se muestran las medidas tomadas a todos los animales muestreados para este estudio: “CTR” circunferencia del tórax, “LT” largo total, “AC” altura a la cruz, “LH” largo de rostro y “LO” largo de oreja. Todas estas medidas fueron comparadas entre los dos grupos para saber si existía diferencia estadística entre ellos, sin embargo, en ninguna medida morfométrica mostraron diferencia estadística ($p>0.05$) para asegurar que existe diferencia fenotípica entre el “Grupo 1” (fenotipo asilvestrado) y el “Grupo 2” (fenotipo mezclado).

Medidas morfométricas	Media Grupo 1	Media Grupo 2	Valor de t	Grados de libertad	Intervalo de confianza (95%)	Valor de p
CTR	1022.14	967.50	0.56095	4.421	-205.95 – 315.23	0.6021
LT	1021.21	1022.50	-0.01066	4.242	-328.65 – 326.07	0.9920
AC	709.35	712.50	-0.05779	4.909	-143.71 – 137.43	0.9562
LH	361.78	327.50	1.3386	6.327	-27.61 – 96.18	0.2268
LO	145.35	183.75	-1.7358	3.106	-107.43 – 30.64	0.1778

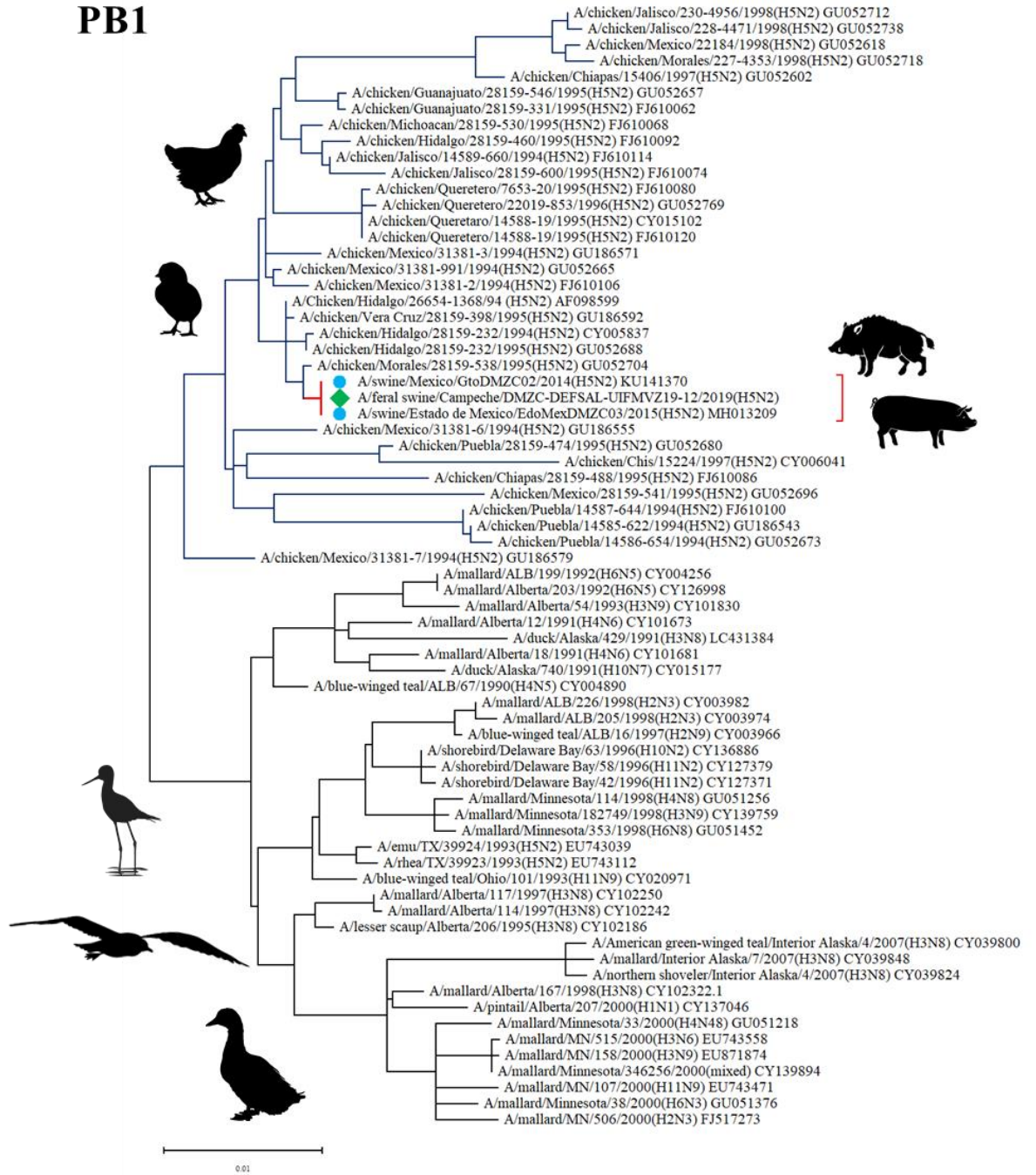


Anexo 8. Individuos positivos en la serología a virus de influenza A. En las fotografías A y B se observa a la cerda asilvestrada “ElRe1” con sus crías, todos seropositivos a virus de influenza A.

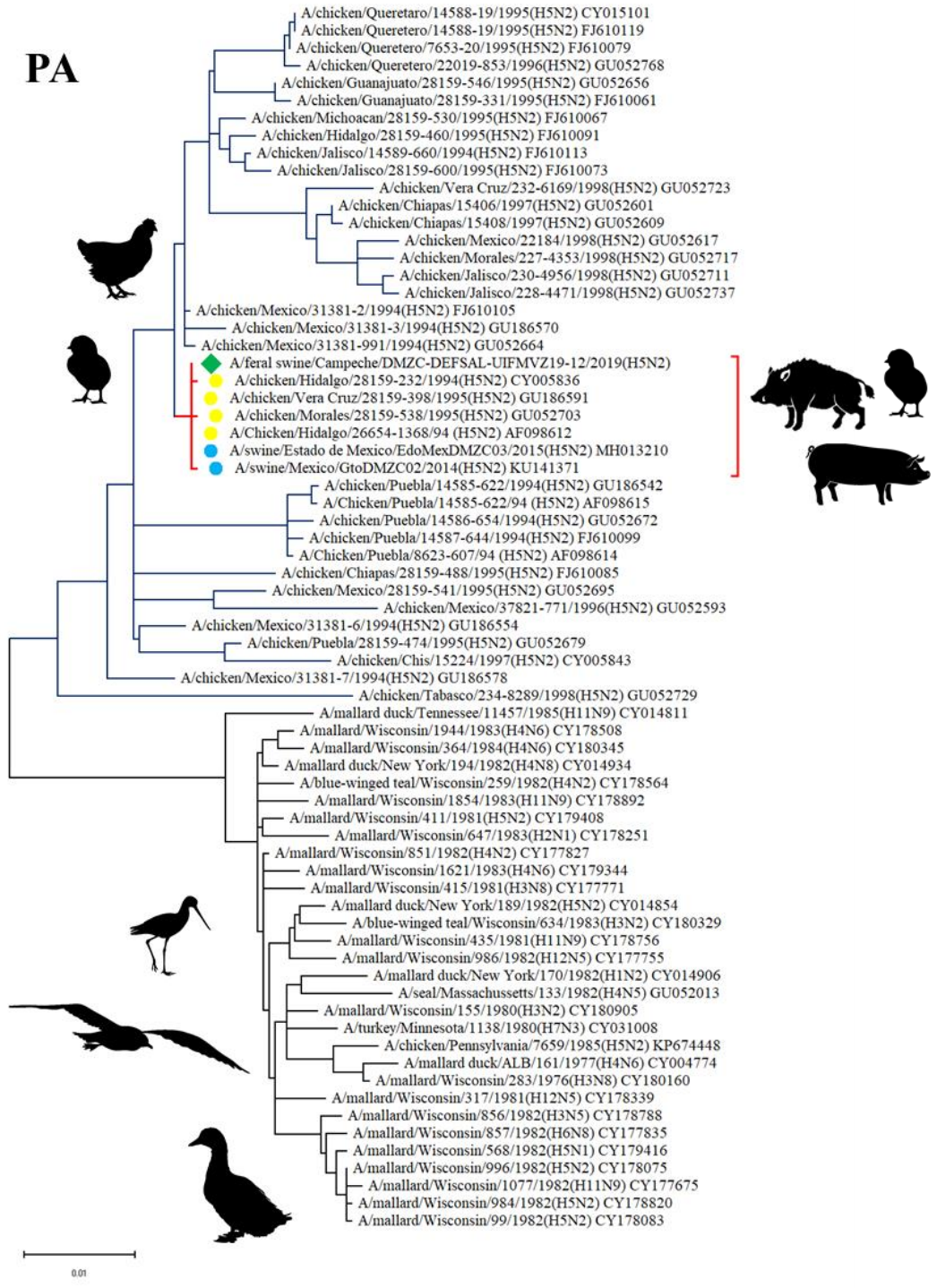
PB2



Anexo 9. Árbol filogenético del gen PB2 del virus de influenza H5N2. El árbol se observa a escala, con longitudes de rama correspondientes al número de sustituciones por sitio. El virus H5N2 aislado se encuentra marcado con la siguiente figura: ◆, mientras que los virus porcinos H5N2 se observan marcados con la siguiente figura: ●.

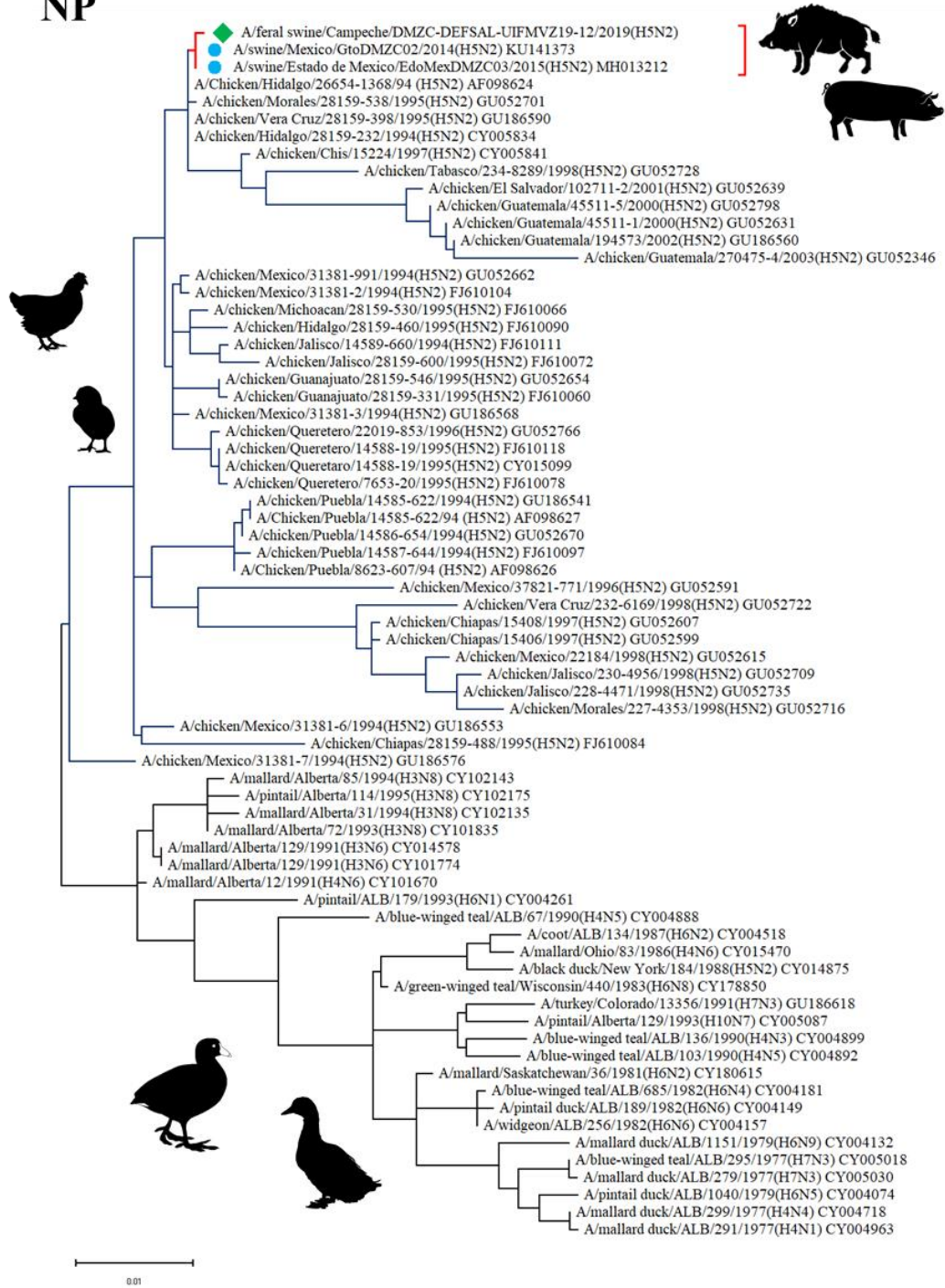


Anexo 10. Árbol filogenético del gen PB1 del virus de influenza H5N2. El árbol se observa a escala, con longitudes de rama correspondientes al número de sustituciones por sitio. El virus H5N2 aislado se encuentra marcado con la siguiente figura: ◆, mientras que los virus porcinos H5N2 se observan marcados con la siguiente figura: ●.

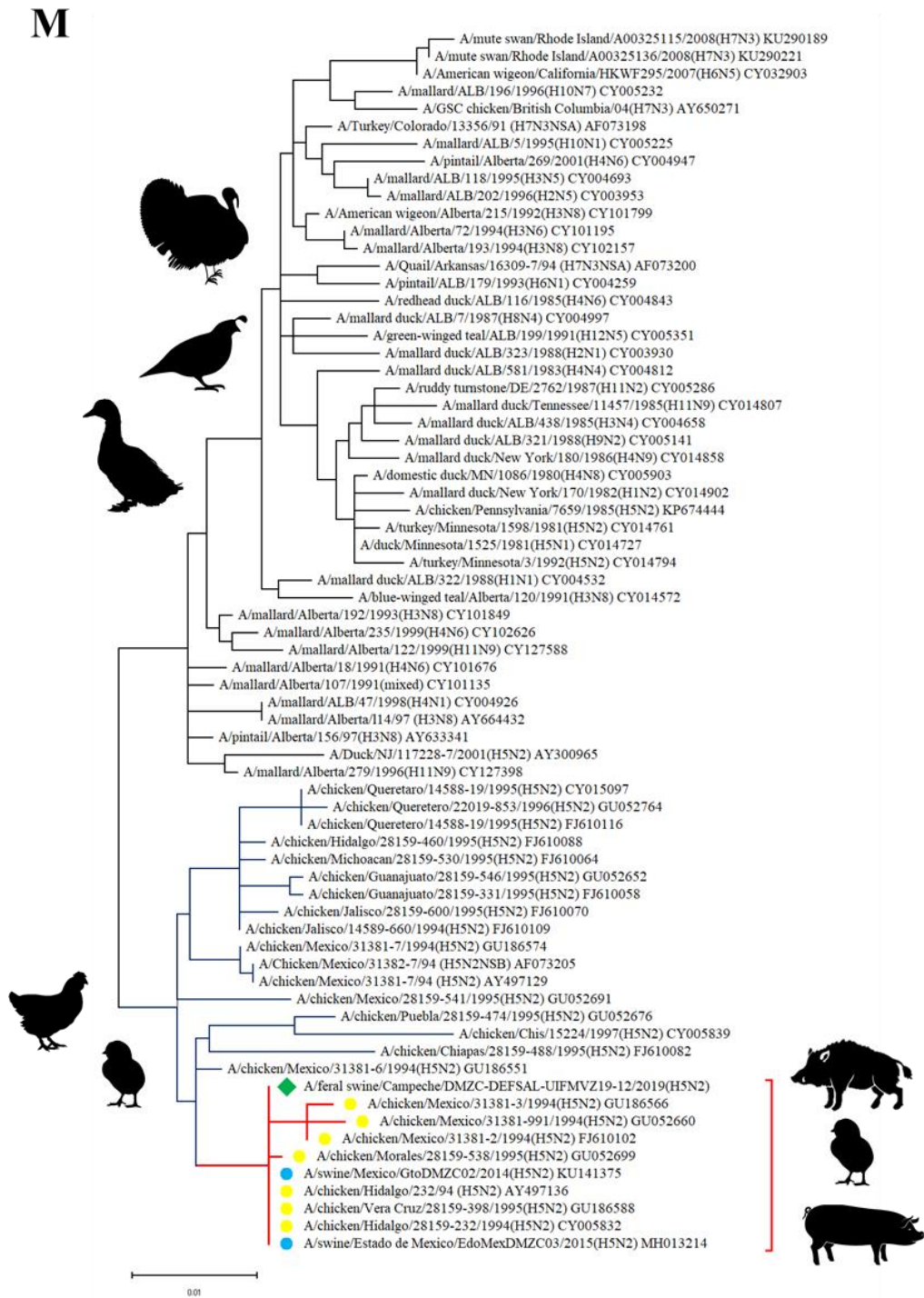


Anexo 11. Árbol filogenético del gen PA del virus de influenza H5N2. El árbol se observa a escala, con longitudes de rama correspondientes al número de sustituciones por sitio. El virus H5N2 aislado se encuentra marcado con la siguiente figura: ◆, mientras que los virus porcinos H5N2 se observan marcados con la siguiente figura: ● y el virus aviar H5N2 con la figura: ●.

NP

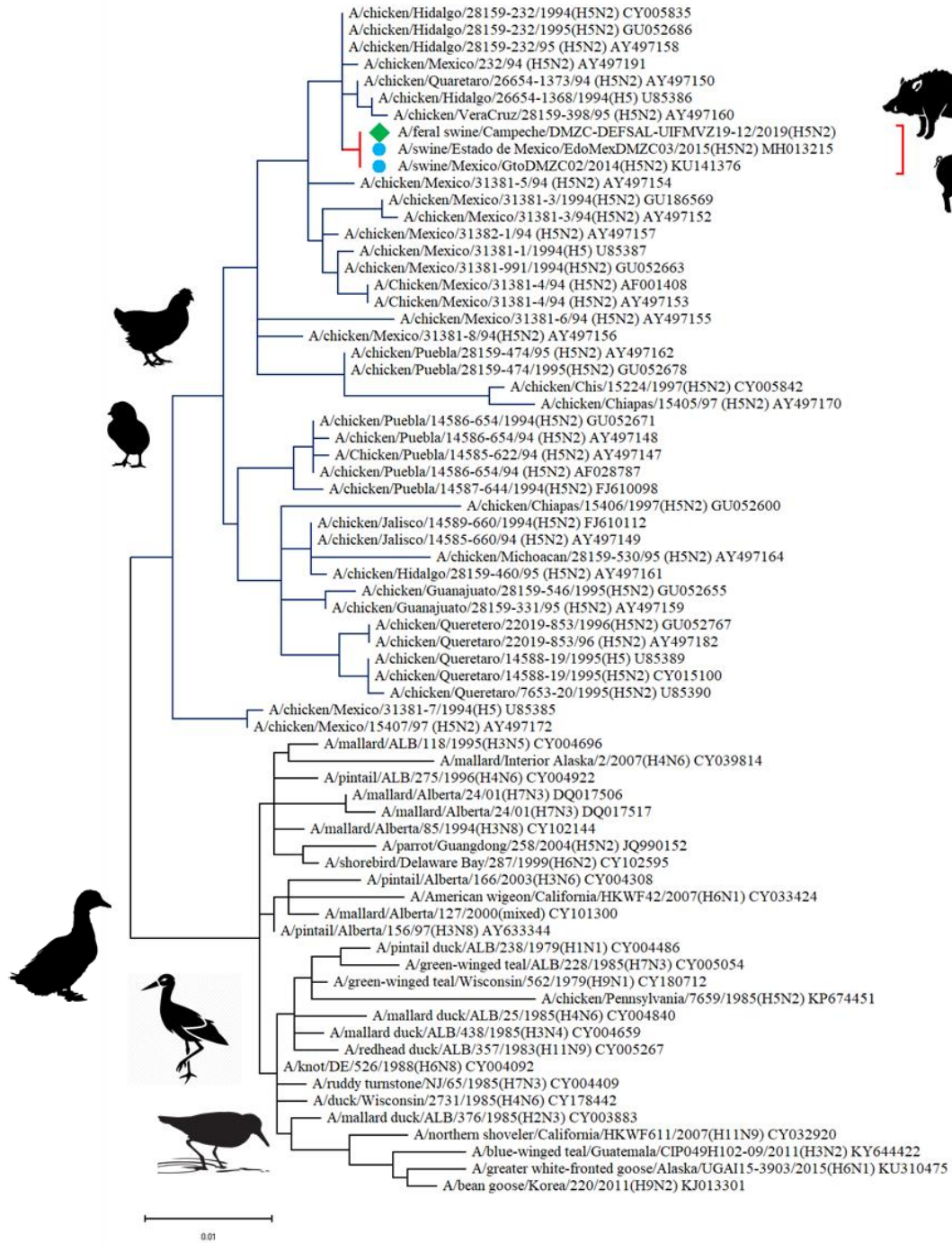


Anexo 12. Árbol filogenético del gen NP del virus de influenza H5N2. El árbol se observa a escala, con longitudes de rama correspondientes al número de sustituciones por sitio. El virus H5N2 aislado se encuentra marcado con la siguiente figura: ◆, mientras que los virus porcinos H5N2 se observan marcados con la siguiente figura: ●.



Anexo 13. Árbol filogenético del gen M del virus de influenza H5N2. El árbol se observa a escala, con longitudes de rama correspondientes al número de sustituciones por sitio. El virus H5N2 aislado se encuentra marcado con la siguiente figura: ◆, mientras que los virus porcinos H5N2 se observan marcados con la siguiente figura: ● y el virus aviar H5N2 con la figura: ●.

NS



Anexo 14. Árbol filogenético del gen NS del virus de influenza H5N2. El árbol se observa a escala, con longitudes de rama correspondientes al número de sustituciones por sitio. El virus H5N2 aislado se encuentra marcado con la siguiente figura: ◆, mientras que los virus porcinos H5N2 se observan marcados con la siguiente figura: ●.

Anexo 15. Número de sitios e individuos muestreados por cuadrante y su valor de INRA. En la primera columna se muestra el número de cuadrante creado para el análisis de antropización del paisaje, en la segunda columna se muestra el número de sitios que incluía cada uno de los cuadrantes al igual que la siguiente columna que muestra el número de individuos muestreados en cada uno de los cuadrantes. La última columna, muestra el índice de antropización del paisaje. La escala de colores va desde verde a gris, donde verde representa el valor mayormente conservado o con menor índice de antropización y el color gris representa el valor con mayor índice de antropización, los colores amarillos representan valores de antropización intermedios.

Cuadrante (Área de amortiguamiento)	Número de sitios	Número de individuos	INRA
C1	3	11	2.31
C2	4	8	20.98
C3	1	3	38.22
C4	3	4	29.20
C5	3	10	27.74
C6	3	15	33.72
C7	1	8	29.38
C8	2	2	17.68