



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

**DIVERSIDAD VIRAL EN PATO SILVESTRE**

**TESIS**

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

Presenta:

Luis Alfonso Ramírez Martínez

**Tutor**

Gary García Espinosa (FMVZ-UNAM)

**Comité Tutoral**

Elizabeth Loza Rubio (CENID-INIFAP)  
Juan Joel Mosqueda Gualito (F. Ciencias-UAQ)

Ciudad Universitaria, CDMX febrero 2019



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**

Dedico esta tesis no solo a las personas que ayudaron a la realización de mis estudios, también a quienes han contribuido durante toda mi vida para convertirme en la persona que soy ahora.

A mis padres, porque lo que tengo se los debo a ellos, y que me han dejado la mejor herencia de todas. A mi madre que me ha enseñado que no existen limitaciones y el valor del amor, a mi padre que me dio valores y es modelo a seguir.

A mis hermanos, porque siempre podré contar con ustedes.

A ti Mary, conmigo una vida,  
paciente me aconsejas y perdonas  
que incondicional día con día,  
tierna me enamoras.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca que me fue otorgada para la realización de mis estudios.

A los proyectos que financiaron mi investigación: PAPIIT IN218716, SEMARNAT-UNAM 35928-2377-9-X-13.

Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el financiamiento para la presentación de mi trabajo en congresos.

A mi tutor el doctor Gary García Espinosa por la oportunidad, la confianza, sus conocimientos y la amistad que me brindó.

A los miembros de mi comité tutorial; la doctora Elizabeth Loza Rubio y el doctor Joel Mosqueda Gualito. Por el apoyo brindado durante el desarrollo de mi proyecto.

A los miembros del jurado, por su disponibilidad y el tiempo dedicado a revisar mi tesis.

Al doctor Moisés Cortés y al Centro Nacional de Recursos Genéticos (CNRG-INIFAP) .  
También a la doctora Laura Ongay y el Instituto de Fisiología Celular, Unidad de Biología Molecular, UNAM.

A mis compañeros de laboratorio.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, mi alma máter.

## RESUMEN

Las aves acuáticas dependen de los humedales para su ciclo de vida y en este ecosistema conviven además con especies de anátidos silvestres migratorios incluidos los patos. Los patos silvestres se consideran reservorios de *Influenza virus A*, también se han descrito otros géneros virales pero solamente se han reportado de manera ocasional durante brotes en especies domésticas. La comunidad de virus en aves acuáticas en su hábitat natural no está ampliamente explorada, debido en parte a la difícil caracterización molecular y biológica con técnicas convencionales de rutina. El objetivo de este estudio fue describir la diversidad viral (virus aviares y no aviares) y la composición del viroma en varias especies de patos silvestres migratorios durante la temporada de invierno en un humedal en el altiplano central de México. Se obtuvieron por donación patos silvestres migratorios de ocho especies distintas de la zona de las Ciénegas de Lerma en el Estado de México. Las muestras de heces se colectaron directamente del recto de los animales, se purificaron y secuenciaron las partículas de ADN y ARN en las plataformas *Ion Torrent* y *MiSeq Illumina*. Con la clasificación taxonómica de las secuencias obtenidas se detectaron principalmente las familias virales *Herpesviridae*, *Myoviridae*, *Poxviridae* y *Adenoviridae*, y también familias virales de peces, insectos, plantas y bacterias. La comunidad intestinal de los patos silvestres mostró una gran diversidad de virus de diferentes huéspedes. Además, la composición del viroma entre especies de patos silvestres fue diferente. El papel de los nuevos virus que podrían encontrarse en el intestino de los patos silvestres no se ha estudiado completamente. Se necesita continuar estudiando los virus que probablemente albergan los patos silvestres y que podrían estar acarreando de ambientes impactados por actividades humanas, para monitorear un potencial riesgo zoonótico o brotes en animales domésticos.

**Palabras clave:** viroma, patos silvestres, humedal, metagenómica, secuenciación masiva

## ABSTRACT

Waterfowl depend on the wetlands to complete their life cycles and in this ecosystem they coexist with migratory wild anatids species, including ducks. Wild ducks are considered reservoirs for *Influenza virus A*. In addition, other viral genera have been described, but they have only been reported occasionally during outbreaks in domestic species. The community of viruses in waterfowl in their natural habitat is not fully researched due to the difficult molecular and biological characterization with conventional techniques. The objective of this study was to describe the viral diversity (avian and non-avian viruses) and the fecal virome composition in several species of migratory wild ducks during the wintering stayover in a wetland in the central high plateau of Mexico. Migratory wild ducks of eight different species from Ciénegas de Lerma in the State of Mexico were obtained by donation. Fecal samples were collected directly from the rectum of the animals; the DNA and RNA particles were purified and sequenced on the Ino Torrent and MiSeq Illumina platforms. With the taxonomic classification of the sequences obtained, the viral families *Herpesviridae*, *Myoviridae*, *Poxviridae* and *Adenoviridae* were detected, as well as viral families of fish, insects, plants and bacteria. The intestinal community of the wild ducks showed a great diversity of viruses from different hosts, and the composition of the viroma between species was different. The role of new viruses that could be found in the intestines of wild ducks has not been fully studied. It is necessary to continue studying the viruses harbored by wild ducks from impacted environments by human activities for monitoring the potential zoonotic risk or outbreaks in domestic animals.

**Keywords:** virome, wild ducks, wetland, metagenomics, high throughput sequencing

## CONTENIDO

	<b>Página</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>V</b>
<b>LISTA DE CUADROS.....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>9</b>
<b>II. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>	<b>12</b>
<b>III. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>22</b>
<b>IV. HIPÓTESIS.....</b>	<b>23</b>
<b>V. OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
<b>VI. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
<b>VII. RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
<b>VIII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>42</b>
<b>IX. CONCLUSIONES.....</b>	<b>46</b>
<b>X. ANEXO 1 (artículo publicado).....</b>	<b>47</b>
<b>XI. REFERENCIAS.....</b>	<b>62</b>

## **LISTA DE CUADROS**

Cuadro 1. Listado de familias y géneros virales que se han reportado en el tracto intestinal en anátidos.

Cuadro 2. Secuencias clasificadas al taxón viral.

Cuadro 3. Especies de virus de las principales familias identificadas en heces de patos silvestres.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de la distribución de los humedales a nivel mundial.

Figura 2. Distribución de los principales humedales en México.

Figura 3. Localización del área de estudio.

Figura 4. Flujograma del procesamiento de las muestras

Figura 5. Clasificación taxonómica de las secuencias obtenidas con la plataforma *Ion Torrent*.

Figura 6. Porcentaje de virus eucariotas ordenados por tipo de hospedero.

Figura 7. Abundancia general de familias virales identificadas en patos silvestres.

Figura 8. Curvas de rarefacción de los *pools* de heces de patos silvestres.

Figura 9. Comparación de las principales familias virales identificadas en las especies de patos silvestres.

Figura 10. Mapa de calor que muestra las abundancias relativas de las familias virales.

Figura 11. Análisis de coordenadas principales de las composiciones del viroma de patos silvestres.

## I. INTRODUCCIÓN

Los humedales son ecosistemas que se caracterizan por tener un medio acuático dulce, salobre o salado donde habitan plantas y animales (Ramsar Convention Secretariat, 1971). Cinco tipos de humedales son reconocidos en forma general el marino, estuarino, lacustre, ribereño y palustre (Ramsar Convention Secretariat, 2016). Estos ecosistemas son importantes a nivel global porque desempeñan una función en diferentes ciclos biológicos (energía, nutrientes, componentes químicos, etc.) (Aber, 2012a). Los humedales también realizan funciones importantes como prevención de tormentas, control de inundaciones y absorción de nutrientes y desechos (Barbier, 1993). También albergan una gran diversidad biológica de animales vertebrados y de organismos invertebrados (Nyman, 2011). Las aves acuáticas habitan los humedales por largos periodos durante ciertas estancias del año o durante sus ciclos de vida para aprovechar la comida, protegerse de los depredadores o anidar (Aber, 2012b).

Los humedales de México, tanto costeros como interiores, son importantes para numerosas especies residentes y endémicas de animales y plantas (SEMARNAT, 2017). México cuenta con una gran cantidad de zonas consideradas como humedales. Estos ambientes acuáticos concentran el 15% de la avifauna en México, en donde más de 300 especies de aves migratorias pasan la temporada de invierno en nuestro país lo que representa más del 80% de aves acuáticas migratorias de América del Norte (Navarro-Sigüenza *et al.*, 2014). Los anátidos (patos y gansos) son las aves más abundantes que llegan a los humedales de las costas del pacífico y golfo de México, así como en menor proporción a los localizados en el altiplano (SEMARNAT, 2017). La migración permite la convivencia de diferentes poblaciones de anátidos en tiempo y espacio en humedales o cuerpos de agua destinados para la alimentación, reproducción y descanso. La contribución de los patos silvestres al ecosistema acuático se ha documentado en su participación como control de insectos y polinización además, dispersores de semillas, (Green and Elmberg, 2014), de propágulos de plantas acuáticas, algas y algunos organismos acuáticos invertebrados en las heces (Charalambidou and Santamaría, 2005). Por otro lado, a los patos silvestres se les señala como diseminadores de virus a diferentes lugares (Ramey *et al.*, 2013), y a otras especies de aves como los pollos y pavos (Kim *et al.*, 2007). Lo anterior ha propuesto a los patos silvestres como indicadores biológicos de salud (Fouchier and Munster, 2009).

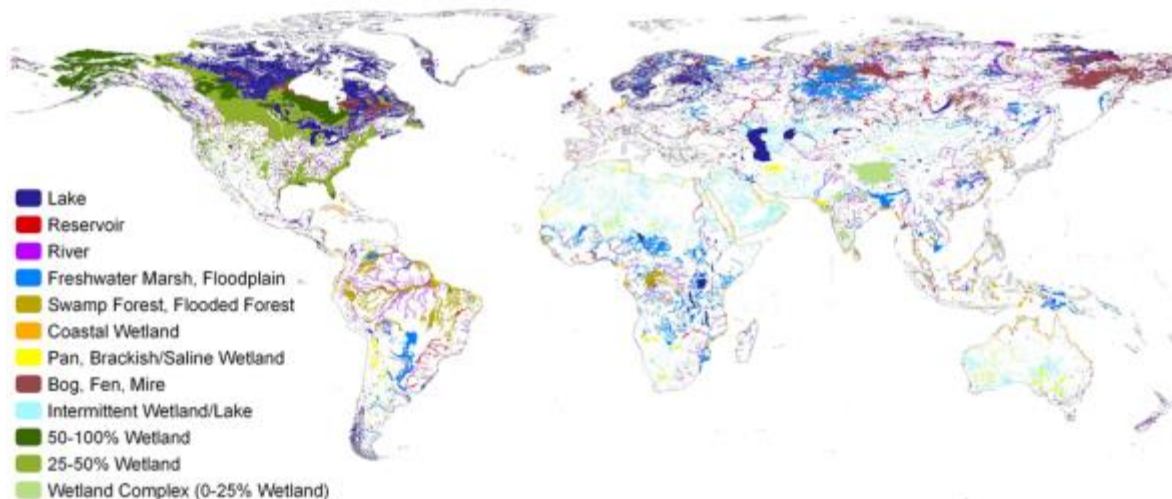
Los ambientes acuáticos y las aves, especialmente del orden *Anseriformes* y *Charadriiformes*, se consideran potencialmente como reservorios de diferentes virus aviáres. Los patos silvestres se consideran el principal reservorio natural y diseminador de *Influenza virus A* en diferentes continentes (Webby *et al.*, 2007). Algunos autores sugieren que también son reservorios del *Avulavirus aviar 1* (Jorgensen *et al.*, 2004), y más reciente del *Coronavirus aviar* (Chu *et al.*, 2011) debido a que estos virus infectan a muchos órdenes de la clase aves tanto acuáticas como terrestres (Alexander, 2000). Estos virus infectan principalmente células del tracto intestinal de los anátidos y se excretan en grandes concentraciones en las heces, por lo que la ingestión directa de agua contaminada con heces conduce a la transmisión a través de la ruta fecal-oral (Hinshaw *et al.*, 1979). También se ha reportado la presencia de otros géneros virales asociados al intestino de anátidos domésticos o silvestres en diferentes países como son los adenovirus (Brash *et al.*, 2009), astrovirus (Chu *et al.*, 2012), herpesvirus (Keel *et al.*, 2013), polyomavirus (Corrand *et al.*, 2011), retrovirus (Jiang *et al.*, 2012), parvovirus (Poonia *et al.*, 2006), picornavirus (Liao *et al.*, 2014), reovirus (Yu *et al.*, 2014), rotavirus (Takehara *et al.*, 1991) y avibirnavirus (Jeon *et al.*, 2008). Sin embargo, no existen datos de la comunidad viral intestinal en aves acuáticas silvestres.

Para la identificación y caracterización de virus o comunidades microbianas nuevas o poco conocidas, se ha utilizado la metagenómica como un medio directo e imparcial (Bragg L and Tyson GW, 2014). Esta herramienta permite hacer estudios posteriores de evolución y epidemiología (Radford *et al.*, 2012). También, la identificación de virus que no pueden ser cultivados de forma convencional (Breitbart *et al.*, 2003). Además, ha permitido identificar géneros virales que no se sabían cómo posibles huéspedes en algunas especies (Victoria *et al.*, 2009; Bodewes *et al.*, 2014; Sachsenroder *et al.*, 2014; Ge *et al.*, 2012). En aves, los estudios de secuenciación masiva han identificado material genético de virus que no habían sido reportados (Day *et al.*, 2010; Shah *et al.*, 2016). Además de los géneros virales propios de los vertebrados, también se han identificado secuencias parciales del genoma de virus de plantas, insectos, algas y protozoarios, en heces de distintas especies (Motooka *et al.*, 2015; Shah *et al.*, 2014; Donaldson *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2010). La identificación de virus en aves acuáticas en México se ha limitado a la presencia de *Influenza virus A* en heces de anátidos silvestres migratorios del género *Anas* spp (Cuevas-Domínguez EA *et al.*, 2009) y a la identificación del virus en agua del ecosistema acuático durante la época invernal (Ornelas-Eusebio *et al.*, 2015).

Para entender la relación de los virus presentes en los patos silvestres migratorios que conviven con otros organismos y microorganismos en un ambiente acuático, es necesario conocer y caracterizar la diversidad viral presente. Los objetivos del trabajo que se presenta son conocer las familias de virus ARN y ADN presentes en patos silvestres migratorios en su hábitat acuático. Además, identificar la composición del viroma en diferentes especies de patos silvestres a través del análisis de metagenómica para determinar la diversidad de virus aviares y no aviares presentes.

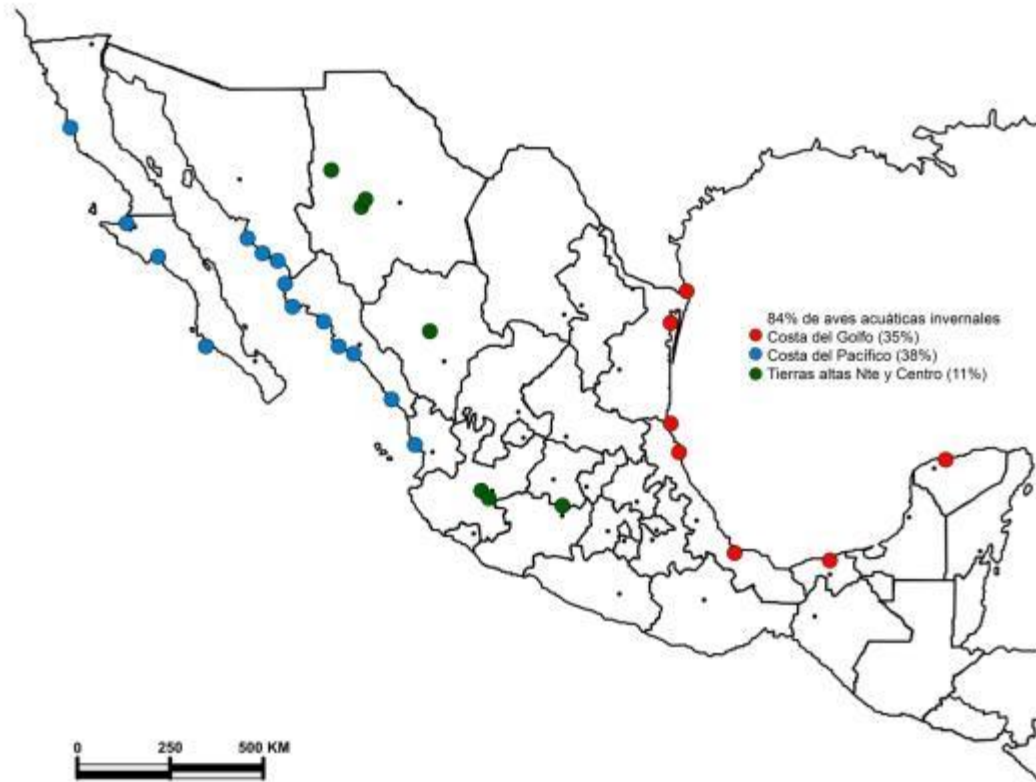
## II. REVISIÓN DE LITERATURA

Los humedales son ecosistemas que incluyen tres características: se distinguen por la presencia de agua poco profunda o saturada, tienen condiciones únicas del suelo y la biota está adaptada a las condiciones de humedad (Mitsch and Gosselink, 2015). Algunos ejemplos de hábitats que están incluidos son: lagos, pantanos, estuarios, marismas, ciénegas, entre otros (Mitsch and Gosselink, 1986). Sin embargo, estas características se modifican enormemente de un ambiente a otro, ya que la profundidad del agua varía entre humedales, muchos de ellos están entre los límites de agua profunda y tierras altas y a su vez son afectados por ambos sistemas. También, hay un rango amplio de microorganismos, plantas y animales que los habitan, por último, los diferentes humedales varían considerablemente de tamaño (entre algunas a miles de hectáreas) y ubicación (de la costa a tierra dentro) (Mitsch and Gosselink, 2015). Debido a estos factores es difícil mencionar una definición precisa de los humedales. La *U.S Fish and Wildlife Service* menciona que los humedales son “...tierras de transición entre los sistemas terrestres y acuáticos, donde el nivel freático suele estar en la superficie o cerca de ella, o la tierra está cubierta por aguas poco profundas...” (Cowardin *et al.*, 1979). En esta misma definición se mencionan tres factores que deben tener estos ambientes “...predominan las plantas acuáticas, el suelo hídrico no drenado y el sustrato está saturado con agua o cubierto por aguas poco profundas en algún momento del año”. La Convención sobre los Humedales define a los humedales como: “...áreas de marismas, pantanos, turberas o aguas naturales o artificiales, permanentes o temporales, con agua estática o fluyente, fresca, salobre o sal, incluidas las áreas de agua marina cuya profundidad con marea baja no exceda los seis metros” (Ramsar Convention Secretariat, 1971). Esta convención es un tratado inter gubernamental para la conservación y el uso racional de los humedales y sus recursos (Ramsar Convention Secretariat, 2018a). Las diferencias en las definiciones y en la descripción de estos ecosistemas, además de la falta de información y de un inventario de humedales en algunos países hacen complicado el estimar la extensión de humedales que hay a nivel mundial (Finlayson *et al.*, 2018). Aunque, existen diversas estimaciones de la extensión global de los humedales (Finlayson and Davidson, 1999; Ramsar Convention Secretariat, 2010), la estimación de Lehner y Döll (2004) realizada en un estudio más detallado es probablemente la más exacta. Reportan que 6 a 7% de la superficie del planeta corresponde a humedales utilizando la definición de la Convención sobre los Humedales. La distribución de los humedales a nivel mundial se puede observar en la Figura 1.



**Figura 1. Mapa de la distribución de los humedales a nivel mundial.** Modificado de (Lehner and Döll, 2004).

En Norteamérica se encuentran una gran cantidad de ecosistemas acuáticos. Se estima que el 30% del total de humedales que hay en el planeta están en Canadá, E.U.A. y México (Mitsch and Gosselink, 2015). En México no existe un inventario exacto de la superficie que corresponde a humedales. Se estima que son 6 a 8 millones de hectáreas que corresponden a humedales costeros y continentales (Carrera González *et al.*, 2010; Mitsch and Hernandez, 2013). Además, existen 142 sitios en toda la República Mexicana que son considerados humedales de importancia internacional de acuerdo con la Convención de los Humedales (Ramsar Convention Secretariat, 2018c). Existen 28 humedales prioritarios en la República Mexicana que son utilizados por el 83% de aves acuáticas migratorias de Norte América (Figura 2) (SEMARNAT, 2017). La mayoría de los humedales en México se localizan en la zona costera del Golfo de México y del Pacífico, aunque también existen humedales en la zona interior (Mitsch and Hernandez, 2013). Los humedales del Altiplano Central en México se encuentran en la cadena montañosa conocida como cinturón trans volcánico. En la cuenca Lerma-Santiago se generan varios lagos y pantanos (Mitsch and Hernandez, 2013). En esta zona se pueden encontrar hasta 12 especies de anátidos silvestres migratorios que pasan la temporada de invierno (Vazquez Rivera, 2004).



**Figura 2. Distribución de los principales humedales en México.** Sitios prioritarios para las aves acuáticas migratorias durante la temporada de invierno. Modificado de DUMAC 1990. Áreas Lacustres de México. Plan Maestro Año 2000.

Los ecosistemas acuáticos son un recurso natural de importancia mundial. Los humedales cumplen una amplia variedad de funciones, incluido el control de inundaciones, la purificación del agua, la estabilización del litoral y el control de la erosión (Groombridge, 1992; Scholz, 2011). Los humedales también contribuyen a la regulación de los gases de efecto invernadero a través del secuestro de carbono (Chmura *et al.*, 2003; Bridgham *et al.*, 2006). Estos ecosistemas proveen diferentes beneficios para el medio ambiente y las comunidades aledañas como resultado de estas funciones (Pasupalati *et al.*, 2017). Además, albergan una gran diversidad de plantas y animales (Nyman, 2011). Aproximadamente el 40% de las especies del mundo dependen de los humedales y una gran cantidad (80%) de las especies de aves en América del Norte usan los humedales en algún momento durante su ciclo de vida (Gray *et al.*, 2013b; Mitsch and Gosselink, 2015). Muchas especies de animales que usan los humedales (principalmente las aves acuáticas) tienen una gran importancia económica y recreativa (Gray *et al.*, 2013a). Hay al menos 60 especies de aves acuáticas que se reproducen en América del Norte, aunque mayor importancia se

ha centrado históricamente en los patos, porque son los más abundantes y también valiosos para la caza (Gray *et al.*, 2013b). Las principales especies de aves que llegan a nuestro país pertenecen a las familias *Anatidae* y *Gruidae*, estas especies tienen un valor importante en la actividad cinegética en nuestro país (SEMARNAT, 2017). Aunque existen organismos que regulan las actividades en los humedales, se estima que hemos eliminado más de la mitad de los humedales del mundo, además un gran porcentaje está afectado por actividades humanas (LePage, 2011). En particular las llanuras de inundación de los ríos, deltas y estuarios, se ven especialmente afectados por las actividades antropogénicas (Bobbink *et al.*, 2006). Uno de los principales problemas que genera la pérdida de estos ecosistemas es el crecimiento urbano (Dahl and Stedman, 2013). Debido a esto es importante realizar actividades de conservación y restauración de estos hábitats para garantizar la permanencia de las aves acuáticas en estos ecosistemas, ya que estos animales proveen de beneficios al ecosistema. Existe una relación estrecha entre los humedales y los distintos roles de las aves acuáticas en estos ambientes (Green and Elmberg, 2014). Las aves acuáticas pueden transportar en las heces y dispersar: semillas de plantas (Proctor, 1968; Figuerola and Green, 2002), propágulos de organismos invertebrados (Green and Figuerola, 2005) y de plantas acuáticas (Brochet *et al.*, 2009). También, ayudan al control de plagas (Teo, 2001; Miles *et al.*, 2002) y en la diversidad de plantas (Jasmin *et al.*, 2008). Además, funcionan como indicadores ecológicos (Nummi *et al.*, 2000; Green *et al.*, 2002) y se pueden utilizar para el monitoreo de algunas enfermedades (Wallensten *et al.*, 2007; Globig *et al.*, 2009; Ziegler *et al.*, 2010). Sin embargo, algunas aves acuáticas también favorecen la diseminación de algunas enfermedades a otras especies de animales incluido el humano (Sanchez *et al.*, 2016). Se ha considerado que los ecosistemas acuáticos de agua dulce tienen entre  $10^5$  a  $10^9$  partículas tamaño viral por mililitro de superficie de agua dulce y concentraciones similares también pueden ser encontradas en aguas salinas o salobres, así como en sedimento y tierra (Sano *et al.*, 2004).

Existen 145 géneros virales que infectan a vertebrados, comprendidos en 33 familias, lo que representa el 41% del total de géneros conocidos y clasificados (King *et al.*, 2011a). En la clase de las aves se han reportado 19 familias y 28 géneros que pueden infectar a especies domésticas y silvestres (McFerran and McNulty, 1993; King *et al.*, 2011a). Sólo 11 géneros se han encontrado en el intestino o heces de aves acuáticas del orden *Anseriformes* (Cuadro 1). Estos animales se consideran potencialmente como reservorios de diferentes virus aviáres (Webby *et al.*, 2007). Los



géneros virales *Alfainfluenzavirus* y *Avulavirus* son los más estudiados en la familia *Anatidae* del orden *Anseriformes*, donde se incluyen a los patos.

**Cuadro 1. Listado de familias y géneros virales que se han reportado en el tracto intestinal en anátidos.**

<b>Genoma</b>	<b>Familia</b>	<b>Género</b>	<b>Referencia</b>
ADN	<i>Herpesviridae</i>	<i>Mardivirus</i>	(Keel <i>et al.</i> , 2013)
ADN	<i>Adenoviridae</i>	<i>Aviadenovirus</i>	(Cha <i>et al.</i> , 2013)
ADN	<i>Circoviridae</i>	<i>Circovirus</i>	(Soike <i>et al.</i> , 2004)
ADN	<i>Parvoviridae</i>	<i>Dependoparvovirus</i>	(Poonia <i>et al.</i> , 2006)
ARN	<i>Birnaviridae</i>	<i>Avibirnavirus</i>	(Jeon <i>et al.</i> , 2008)
ARN	<i>Reoviridae</i>	<i>Orthoreovirus</i>	(Zhang <i>et al.</i> , 2006)
ARN	<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Rotavirus</i>	(Takase <i>et al.</i> , 1986)
ARN	<i>Paramyxoviridae</i>	<i>Avulavirus</i>	(Alexander, 1993)
ARN	<i>Orthomyxoviridae</i>	<i>Alfainfluenzavirus</i>	(Stallknecht and Shane, 1988)
ARN	<i>Coronaviridae</i>	<i>Gamacoronavirus</i>	(Chu <i>et al.</i> , 2011)
ARN	<i>Astroviridae</i>	<i>Avastrovirus</i>	(Chu <i>et al.</i> , 2012)

Los virus de influenza se han aislado de diferentes animales (cerdos, caballos, felinos, aves domésticas) y solo las aves silvestres se consideran como reservorios naturales del virus (Webby *et al.*, 2007). Las aves migratorias tienen un papel importante no solo como reservorios de influenza aviar, también pueden diseminar la infección a otras especies (Webster *et al.*, 1992). Los avulavirus infectan a todos los órdenes de las especies de aves, debido a la amplia gama de hospedadores susceptibles, han sido capaces de establecerse en todo el mundo (Hines and Miller, 2012; Alexander, 2000). Algunos estudios sugieren que las aves acuáticas son el reservorio natural para el *Avulavirus aviar 1* (Huovilainen *et al.*, 2001; Jorgensen *et al.*, 2004; Pfitzer *et al.*, 2000).

El virus de influenza pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*, de esta familia existen actualmente siete géneros: *Alfainfluenzavirus*, *Betainfluenzavirus*, *Deltainfluenzavirus*, *Gamainfluenzavirus*, *Isavirus*, *Quaranjavirus* y *Thogotovirus* (Wolf *et al.*, 2017). El *Influenza*

*virus A* es la especie de virus que pertenece al género *Alfainfluenzavirus*, son virus pequeños de 80 a 120 nm de diámetro, son partículas pleomórficas con un genoma ARN segmentado de ocho moléculas de una sola cadena en sentido negativo que codifica 11 o 12 proteínas virales (King *et al.*, 2011b). En las aves los virus de influenza de baja patogenicidad infectan principalmente células del tracto intestinal y se excretan en grandes concentraciones en las heces (Webster *et al.*, 1992; Olsen *et al.*, 2006). La excreción del virus en el agua conduce a la transmisión entre las aves acuáticas a través de la ruta fecal-oral (Webster *et al.*, 1978; Hinshaw *et al.*, 1979). Esta información sugiere que las aves acuáticas pueden transmitir de manera eficaz el virus de influenza aviar. El virus de influenza evoluciona constantemente, y nuevas variantes antigénicas emergen lo que puede dar lugar a epidemias (Webster, 1998). Los reordenamientos genéticos de diferentes subtipos de virus de influenza aviar pueden suceder en el tracto intestinal de las aves silvestres (Hinshaw *et al.*, 1980). Por lo que se considera a esta población como la mayor fuente de nuevos reordenamientos entre el virus de influenza (Lu *et al.*, 2014; Sharp *et al.*, 1997; Dugan *et al.*, 2008; Wille *et al.*, 2013) Los virus de influenza aviar de alta patogenicidad probablemente se originaron de la introducción de un virus de baja patogenicidad de aves silvestres en aves domésticas (Horimoto *et al.*, 1995). Estos virus se han asilado de materia fecal y depósitos de agua (Deliberto *et al.*, 2009; Barrón, 2009). Las condiciones de pH y temperatura son factores que influyen en la persistencia de los virus en el ambiente (Brown *et al.*, 2009; Stallknecht *et al.*, 1990a). Por lo tanto las condiciones ambientales pueden influir en que los virus sean capaces de seguir circulando en las aves silvestres como reservorios (Brown *et al.*, 2009). El virus de influenza se mantiene viable y con la capacidad de infectar por largos periodos en el agua (Webster *et al.*, 1978; Stallknecht *et al.*, 1990b; Shoham *et al.*, 2012; Keeler *et al.*, 2012; Nielsen *et al.*, 2013).

Se ha manifestado que la vigilancia de los virus de influenza en las aves silvestres y en los ecosistemas que habitan, es clave para entender el origen, patogenia, evolución y diseminación de estos virus (Medina and Garcia-Sastre, 2011), así como también los procesos por los cuales se transmiten y se mantienen en las aves silvestres migratorias por sus implicaciones para la salud de los seres humanos y animales de producción (Ramey *et al.*, 2010). A la fecha, se sabe que el *Influenza virus A* puede dividirse en dos grandes linajes Eurasiático y Americano (Olsen *et al.*, 2006) y que existe una clara separación de estos virus que circulan en estas áreas geográficas (Krauss *et al.*, 2007).

El *Avulavirus aviar* (AVA) pertenece a la familia *Paramyxoviridae* del género *Avulavirus*. Tiene un genoma segmentado de cadena sencilla en sentido negativo de ARN con seis genes (Lamb and Parks, 2007). El género *Avulavirus* incluye actualmente 19 especies designadas como *Avulavirus aviar 1* al 19 (Kuhn *et al.*, 2017). El más importante es el AVA-1 debido a las grandes pérdidas en la producción de aves. Otros avulavirus han sido aislados de aves silvestres pero la infección y manifestación de signos clínicos de estos virus en aves de producción no es tan severa (Warke *et al.*, 2008). La información sobre la distribución y ecología de los AVA 2-19 en especies silvestres es limitada en comparación con el AVA-1, sin embargo existen estudios donde se han realizado aislamientos en algunas especies (Kim *et al.*, 2007; Hlinak *et al.*, 2006; Coffee *et al.*, 2010), y recientemente existe más información sobre la secuencia de los genes de estos subtipos (Kumar *et al.*, 2010; Subbiah *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2013; Samuel *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2010). El AVA-1 es capaz de infectar a todos los órdenes de las especies de aves, debido a la amplia gama de hospedadores susceptibles, el virus ha sido capaz de establecerse en todo el mundo (Hines and Miller, 2012; Alexander, 2000). La infección en las aves con este virus puede o no manifestarse con signos clínicos, esto depende de la cepa, dosis, vía de exposición, la edad y el estado inmunológico (Alexander and Senne, 2008). El virus es capaz de replicarse en el tracto intestinal y puede ser excretado en grandes cantidades en las heces, por lo que la ingestión directa de agua contaminada con heces ofrece es una vía importante de transmisión (Alexander and Senne, 2008). El AVA-1 se disemina en diferentes lugares debido a la migración de las aves silvestres y a las mutaciones en los genes (Ramey *et al.*, 2013). Además, la cercanía filogenética entre los subtipos aislados en aves de producción y aves silvestres sugiere que existe transmisión del virus entre estas especies (Kim *et al.*, 2007), lo que podría representar nuevos brotes de la enfermedad. También, existe una clara distinción genotípica entre los virus aislados del AVA-1 (Aldous *et al.*, 2003), aunque se reconoce la recombinación de algunos genes de este virus (Miller *et al.*, 2009), y si bien se aíslan en mayor frecuencia ciertos genotipos en algunas regiones del mundo, no se considera una circulación específica de algún genotipo en una región determinada, por el contrario es amplia la distribución del AVA-1 en distintas regiones y continentes debido al movimiento de patos silvestres migratorios (Ramey *et al.*, 2013). Lo opuesto sucede con las otras especies de avulavirus, en donde no se cuenta con información suficiente para respaldar estas hipótesis.

En el género *Gamacoronavirus* se ha estudiado la relación filogenética de algunos de los genes de los virus aislados en patos silvestres, y se ha encontrado estrecha relación con virus que infectan a los pollos de producción (Domanska-Blicharz *et al.*, 2014). Además, se ha sugerido la presencia de un grupo filogenético distinto, cuando se ha utilizado el gen “S” de los virus encontrados en aves silvestres con los virus de pavos y pollos (Durães-Carvalho *et al.*, 2015). No se conoce con certeza si los coronavirus de patos silvestres aislados en distintas regiones son genotípicamente similares o si forman grupos filogenéticamente distintos, y si tienen una relación con los virus en aves domésticas, pero se ha sugerido una marcada diferencia genotípica en los coronavirus de los pavos aislados en Norte América y Europa (Maurel *et al.*, 2011).

Las especies de patos migratorios tienen un papel importante como reservorios y diseminadores de ciertos virus hacia otras especies (Webster *et al.*, 1992; Huovilainen *et al.*, 2001; Jorgensen *et al.*, 2004; Pfitzer *et al.*, 2000). Los virus de influenza y avulavirus son agentes que se aíslan de manera frecuente en los patos; no obstante existe poca información relacionada con los otros nueve géneros virales en los patos silvestres; sólo en los géneros *Alfainfluenzavirus*, *Avulavirus* y *Gamacoronavirus* se ha sugerido que los patos participan como reservorios y que la distribución de estos virus en estas especies es amplia porque se pueden encontrar en patos de diferentes especies y continentes con una presentación continua durante todo el año. Los reportes de la infección de los otros ocho géneros en patos silvestres parecen ser esporádicos, ya que se han relacionado a brotes de enfermedad en especies de patos domésticos.

Los ambientes acuáticos mantienen una carga microbiana importante, en su mayoría virus (Mizuno *et al.*, 2013; Wommack and Colwell, 2000). Pero es escasa la información sobre la presencia y distribución de estos géneros (sin considerar a los virus de influenza que son actualmente los estudiados) en los ecosistemas acuáticos y en los patos. La vigilancia de los virus en las aves silvestres es clave para entender el origen, patogenia, evolución y difusión de estos virus (Medina and Garcia-Sastre, 2011). También los procesos por los cuales se transmiten y se mantienen en las aves silvestres migratorias, ya que tienen implicaciones para la salud de los seres humanos y animales de corral (Ramey *et al.*, 2010). El tomar muestras del ambiente es una técnica valiosa y fácil para evaluar la diversidad de los virus lugares específicos (Lang *et al.*, 2008), ya que la búsqueda de los virus en reservorios naturales aumentará el conocimiento sobre la predominancia y la ecología de estos en las poblaciones de aves de producción (Miller *et al.*,

2010). Múltiples estudios han podido evidenciar la existencia de virus en patos silvestres, sin embargo la mayoría utiliza el aislamiento convencional y técnicas de PCR para identificar un virus patógeno de forma específica. Pocos trabajos toman al viroma como muestra de estudio. La secuenciación aleatoria debe ser incorporada como una herramienta para identificar nuevos genotipos, que permita mejorar la comprensión de la evolución molecular, la epidemiología y transmisión entre estos virus (Olson *et al.*, 2014; Miller *et al.*, 2010).

La secuenciación de última generación es una metodología que está cambiando la forma de estudiar y entender la evolución y la ecología viral. Esta herramienta facilita la generación de información que pueda establecer patrones de evolución de virus, por ejemplo en muestras clínicas en humanos (Cotten *et al.*, 2014). También, ha permitido identificar géneros virales que no se sabían cómo posibles huéspedes en algunas especies, y también nuevos géneros virales; esto en muestras de heces de humanos (Victoria *et al.*, 2009), carnívoros (Bodewes *et al.*, 2014; Smits *et al.*, 2013), roedores (Sachsenroder *et al.*, 2014) y murciélagos (Ge *et al.*, 2012). Así como en muestras del ambiente (Smits *et al.*, 2013; Kim and Mundt, 2011; Edwards and Rohwer, 2005). Asimismo, permite la identificación de virus que no pueden ser cultivados de forma convencional (Breitbart *et al.*, 2003; Willner and Hugenholtz, 2013; Mokili *et al.*, 2012), y es un medio directo e imparcial para conocer el potencial funcional de las comunidades microbianas (Bragg L and Tyson GW, 2014). Por lo tanto, puede facilitar la vigilancia de patógenos virales, la identificación de nuevos virus y la comprensión de la ecología viral (Kim *et al.*, 2013; Radford *et al.*, 2012).

Los estudios de secuenciación masiva, donde la muestra de estudio son las heces de aves, han identificado material genético de virus que no habían sido reportados, como sapovirus y lagovirus, y distintos genotipos de otros virus como el de picobirnavirus en pavos (Day and Zsak, 2013). Además de los géneros virales que afectan a vertebrados que se encuentran presentes en estas muestras, también se han identificado secuencias parciales del genoma de virus de plantas, algas y protozoarios, en bovinos y pavos (Motooka *et al.*, 2015; Shah *et al.*, 2014). Aunque se requiere de mayor información de diferentes aves en diferentes ubicaciones geográficas, para poder establecer cuál es el papel de estos virus en animales sanos y enfermos (Shah *et al.*, 2014). En muestras de roedores y murciélagos la identificación de nuevos géneros virales sugiere que estos podrían representar posibles riesgos de transmisión a otras especies, incluido el humano (Ge

*et al.*, 2012; Firth *et al.*, 2014). Los roles de estos virus, presentes en el intestino de estas especies se desconoce, probablemente se consumen del medio ambiente. Por lo tanto, un análisis de metagenómica en muestras fecales de patos silvestres podría ser útil no solo para conocer virus no cultivables, si no para identificar la diversidad y entender la ecología viral del ecosistema.

### **III. JUSTIFICACIÓN**

La mayoría de los estudios de vigilancia epidemiológica se concentran en un género de virus en una determinada especie susceptible, y es un hallazgo el reportar dos virus distintos en el mismo hospedero en forma natural. El tener la posibilidad de conocer si existe una comunidad o no de virus y otros microorganismos en el hospedero, nos permitirá comenzar a conocer las posibles interacciones positivas o negativas con el resto de la biota intestinal del pato y su potencialidad para transmitirse y adaptarse a otras especies en forma exitosa; lo que conllevaría a mejorar los métodos de diagnóstico y medidas de control de aquellos virus con probable importancia económica. Considerando que los patos por su comportamiento tienen un contacto directo y estrecho con el ecosistema acuático y que son pocas las enfermedades que los afectan, son un grupo de aves que pueden servir como hospedero acarreador de diversos virus.

#### **IV. HIPÓTESIS**

Existen virus de diferente género dentro de la misma comunidad intestinal de patos silvestres.

#### **V. OBJETIVO GENERAL**

Conocer la diversidad viral intestinal de patos silvestres migratorios en vida silvestre a través de la identificación y caracterización molecular de la familia de virus, durante la época de otoño-invierno.

##### **Objetivos específicos**

Conocer la diversidad viral intestinal en patos silvestres mediante el análisis masivo del viroma.

Detectar mediante herramientas bioinformáticas las secuencias de nucleótidos con similitud a virus.

Determinar la diversidad de las familias de virus presentes en las heces de patos silvestres migratorios.

Analizar la composición del viroma entre distintas especies de patos silvestres mediante análisis bioinformáticos.



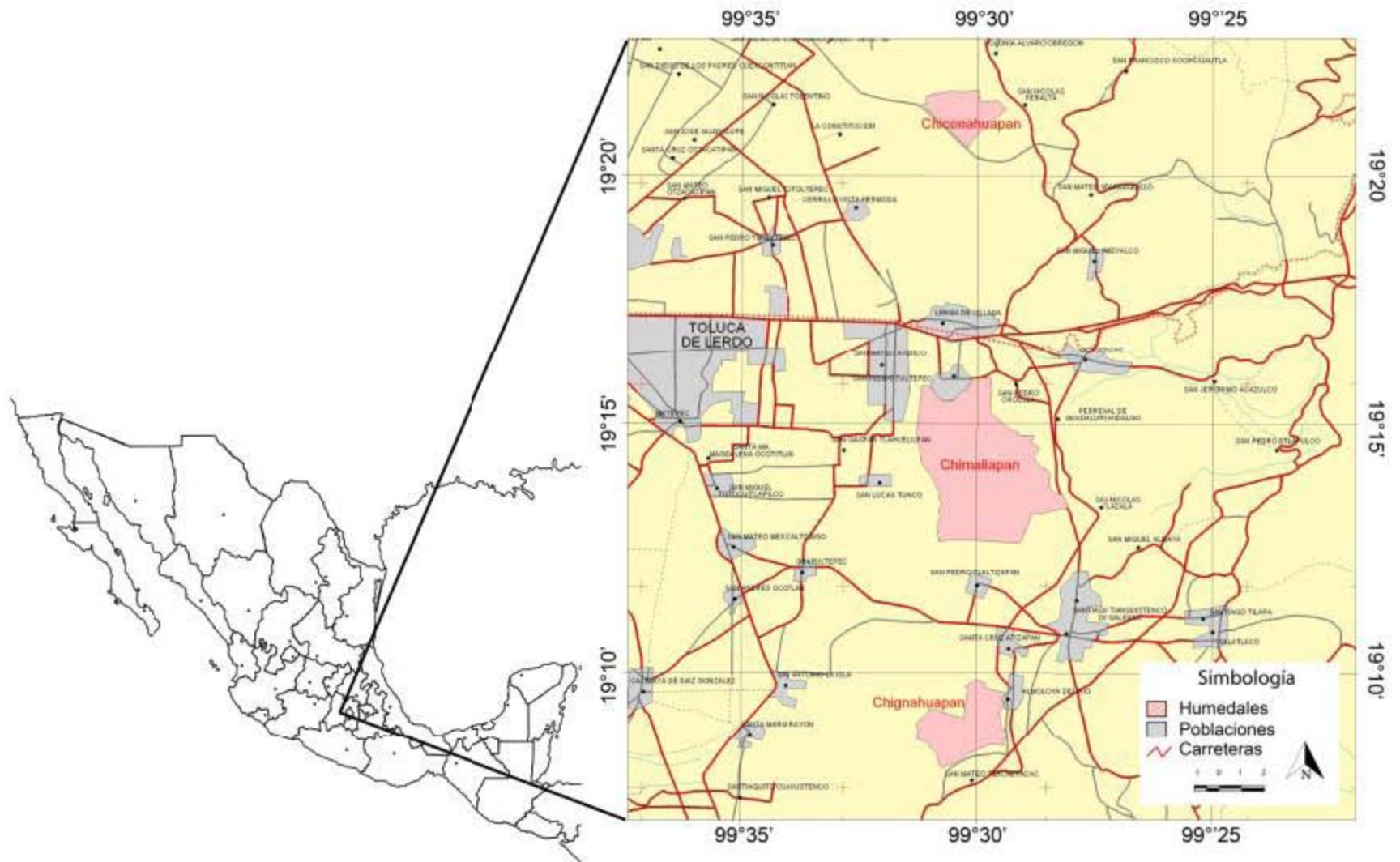
## VI. MATERIAL Y MÉTODOS

### Zona de estudio

Este estudio se realizó en los humedales norte (laguna Chiconahuapan) y sur (laguna Chignahuapan) de las Ciénegas de Lerma, en el altiplano central de México. Esta área está reconocida como un sitio de importancia internacional (Ramsar Convention Secretariat, 2018b). Los humedales están ubicados en el Estado de México dentro de los Municipios de Lerma, Almoloya del Río, Texcalyacac y Santa Cruz Atizapan (Figura 3) (19° 09 '34.4 "N, 99° 29' 48.6" W) (19 ° 21'21.8 "N, 99 ° 31'00.5" W). Estos humedales son sitios de parada para patos silvestres de América del Norte durante las estaciones de otoño e invierno (SEMARNAT, 2008). El área está rodeada por zonas rurales que se utilizan para fines agrícolas y para el ganado de traspatio, como vacas, aves de corral y cerdos (Hernández-Colina *et al.*, 2018).

### Población de estudio y colecta de muestras

Durante el mes de noviembre de 2014 se colectaron en la laguna de Chignahuapan 15 especímenes de patos silvestres muertos donados por cazadores, con el permiso de colecta científico (SGPA/DGVS/08656/14) autorizado por la Dirección General de Vida Silvestre de la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Se obtuvieron las especies: cerceta ala azul (*Spatula discors*), cerceta ala verde (*Spatula crecca*), cerceta canela (*Spatula cyanoptera*) y pato de collar (*Anas platyrhynchos*). Los cadáveres se conservaron a 4 °C para transportarlos al laboratorio de Ecomedicina Aviar de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ-UNAM). Se realizó la disección de los cadáveres en la sala de necropsias del Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves de la FMVZ. De cada uno de los ejemplares se colectaron de manera estéril las heces desde el inicio de los ciegos y hasta el final de la cloaca. Las heces (0.5 a 1g aprox.) se almacenaron en un tubo estéril de plástico de 15 ml y se mantuvieron en congelación a -75 °C.



**Figura 3. Localización del área de estudio.** Modificado del Servicio de Información sobre Sitios Ramsar, 2018.

Durante los meses de enero y febrero de 2016 también se colectaron sesenta especímenes de patos silvestres clínicamente sanos donados por los cazadores en la laguna de Chiconahuapan. Estos patos pertenecían a las especies: cerceta de ala azul (*Spatula discors*), pato golondrino (*Anas acuta*), cerceta canela (*Spatula cyanoptera*), pato panadero (*Mareca americana*), pato cucharón (*Spatula clypeata*), pato pinto (*Mareca strepera*) y pato tepalcate (*Oxyura jamaicensis*). Las heces se obtuvieron directamente del recto, se colocaron inmediatamente en tubos estériles individuales y posteriormente se mantuvieron a 4 °C hasta su transporte al laboratorio para su almacenamiento a -75 °C. La recolección de muestras y los procedimientos en el presente estudio se realizaron con la aprobación del Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales de la FMVZ (SICUAE, número DC-2016 / 2-3).

### **Procesamiento de muestras**

El procesamiento de las muestras de heces se resume en la Figura 4. Los procedimientos se realizaron de acuerdo con lo descrito previamente por Day *et al.* (2010), Victoria *et al.* (2009) y Ullmann *et al.* (2015). Las muestras individuales de heces se resuspendieron en solución salina tamponada de fosfatos estéril (PBS por sus siglas en inglés) y se homogeneizaron mediante agitación en vórtex. Luego, la mitad del volumen de cinco muestras individuales se combinó para formar *pools* (grupos) de muestras. Se obtuvieron tres *pools* del primer muestreo y 12 *pools* del segundo. Los *pools* se centrifugaron a 7000 x g (Heraeus Biofuge Primo R) durante 15 minutos a 4 °C para clarificar el contenido. El sobrenadante se obtuvo y se filtró a través de membranas de nitrocelulosa estéril de 0,45 µm (Merck Millipore, EE. UU.). A continuación, las partículas de tamaño viral se concentraron mediante ultracentrifugación a 100 000 x g durante 4 horas a 4 °C (Beckman Optima XL-90, SW 40Ti rotor de ángulo fijo), y el pellet se resuspendió en 500 µl de búfer *Tris-HCL* (pH 7.5). Posteriormente, se hizo un tratamiento con una mezcla de nucleasas. Se trataron 100 µl del pellet resuspendido con 32 unidades de *DNasa TURBO* (Ambion, Vilnius, Lituania), dos unidades de *RNase Cocktail* (Ambion, Vilnius, Lituania) y 40 µl de búfer *IX TURBO DNasa*. La reacción se incubó a 37 °C durante 60 minutos y luego a temperatura ambiente durante 5 minutos con 40 µl del búfer de inactivación. Los ácidos nucleicos de ARN y ADN se purificaron utilizando un *kit* comercial (QIAamp MinElute Virus Spin, Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Luego, se cuantificó el ARN utilizando un fluorómetro comercial (Qubit 2.0, Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) y el *kit* comercial *RNA Assay* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.). La primera cadena de

ADN complementario (ADNc) se sintetizó con hexámeros aleatorios utilizando el *kit* comercial *SuperScript® First-Strand Synthesis System* (Invitrogen, CA, EE. UU.) Con la siguiente mezcla: 1 µl de mezcla de dNTP (10 mM), 1 µl de hexámeros aleatorios (50 ng/µl), 7 µl de ARN y 10 µl de agua libre de nucleasas. La reacción se incubó a 65 °C durante 5 minutos y luego a 4 °C durante 2 minutos. Posteriormente, se agregó una mezcla de 2 µl de búfer *10X RT*, 4 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 2 µl de *DTT* (0,1 M) y 1 µl de *RNaseOUT* (40 U / µl), y la mezcla resultante se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos. Luego se agregó un microlitro de *SuperScript® III RT* (200 U/µl) y la reacción se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos, 42 °C durante 50 minutos y 70 °C durante 15 minutos. El ADN de doble cadena (ADNdc) se obtuvo con la enzima ADN polimerasa I (Klenow fragment, Invitrogen, CA, USA) con la siguiente mezcla: 3 µl de búfer *10X React 2*, 5 µl de mezcla de dNTP (10 mM), ADN Polimerasa I (2.5U), 1 µl de ADN ligasa T4, 1 µl de *RNasa H*, ADNc (1 µg) y 30 µl de agua libre de nucleasas. La reacción se incubó durante 60 minutos a 15 °C, y luego se purificó el ADNdc con perlas magnéticas (sistema Agencourt AMPure XP, Beckman Coulter, EE. UU.). El ácido nucleico se cuantificó mediante fluorometría utilizando un *kit* comercial *dsDNA High-Sensitive*, (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.). Y se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Estos procedimientos se realizaron para cada uno de los *pools* del primer y segundo muestreo.

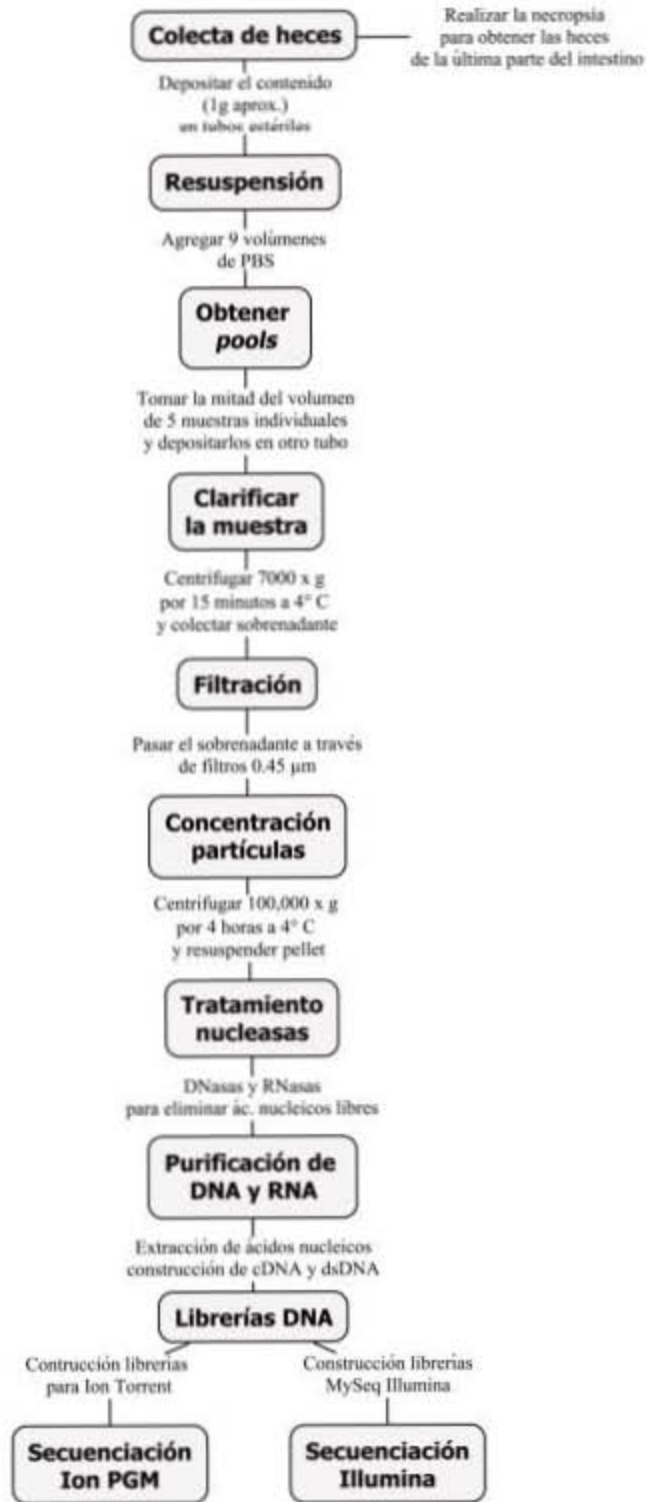


Figura 4. Flujoograma del procesamiento de las muestras

### **Preparación de bibliotecas de ADN y secuenciación en *Ion Torrent***

La preparación de las bibliotecas de ADN y la secuenciación de las muestras del primer muestreo se realizaron en el Centro Nacional de Recursos Genéticos, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CNRG-INIFAP). El ácido nucleico de los tres *pools* se cuantificó, y se fragmentó utilizando el sistema de sonicación *Bioruptor*® (Diagenode) y con el *kit* comercial *Ion Xpress Library*. Se tomaron 200 ng de ADN y se mezclaron con 50 µl de búfer *Low TE*. Se agitaron en vórtex y se realizó la fragmentación mecánica en el sonicador durante 24 minutos. Posteriormente, se agregaron a la reacción 20 µl de búfer *5X End-Repair* y 1 µl de enzima *End-Repair*, se incubaron por 20 minutos a temperatura ambiente y se purificó el ADN con perlas magnéticas (Agencourt AMPure XP). Luego, para realizar la ligación de adaptadores y agregar códigos únicos de identificación (*barcodes*) a las librerías de ADN, se utilizaron los *kit* *Ion Xpress Barcode Adapters*™ (Thermo Fisher Scientific) y *Ion Plus Fragment Library* (Thermo Fisher Scientific). En un tubo se mezclaron los siguientes reactivos: 25 µl de ADN, 10 µl de *10x Ligase Buffer*, 2 µl de *Ion P1 Adapter*, 2 µl de *Ion Xpress Barcode*, 2 µl de *dNTP Mix*, 49 µl de agua libre de nucleasas, 2 µl de ADN ligasa y 8 µl de *Nick-Repair Polimerase*. La mezcla se agitó en vórtex y se colocó en el termociclador a 25 °C por 15 minutos, 72 °C por 5 minutos y se mantuvo a 4 °C. Después de este proceso se realizó la purificación con perlas magnéticas. Las tres bibliotecas con código de barras correspondientes a los tres *pools* se analizaron utilizando el chip *DNA Bioanalyzer High Sensitivity* (Agilent Technologies), y los fragmentos de 400 pb se seleccionaron en un gel de agarosa *E-Gel*® *SizeSelect*™ (Invitrogen).

Las bibliotecas de 400 pb seleccionadas y purificadas se amplificaron utilizando el *kit* *Ion Plus Fragment Library*. Se hizo una mezcla de reacción con 100 µl de *Platinum*® *PCR Super Mix*, 5 µl de *Library Amplification Primer Mix* y 25 µl de las librerías de ADN. La mezcla se colocó en el termociclador a 95 °C por 5 minutos, 95 °C por 15 segundos, 8 ciclos de 58 °C de 15 segundos y finalmente a 70 °C por 1 minuto. La reacción se purificó nuevamente con perlas magnéticas y se realizó la cuantificación de las librerías amplificadas con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa utilizando el *kit* *Ion Library TaqMan*® *Quantitative Assay*. Posteriormente, se preparó un *pool* equimolar de las librerías ajustando la concentración a 26 picomoles y se preparó el templado de librerías con el *kit* *Ion PGM*™ *Template OT2 400*. A continuación, se realizó una cuantificación mediante fluorimetría utilizando un *kit* comercial *Ion Sphere Quality Control*. Finalmente, se procedió a realizar la secuenciación en la plataforma *Ion*

*Torrent PGM* utilizando el *kit Ion PGM™ Sequencing 400* y un chip *Ion 318 V2*.

### **Preparación de librerías de ADN y secuenciación en *MiSeq Illumina***

La preparación de las bibliotecas de ADN y la secuenciación de las muestras del segundo muestreo se realizaron en el Instituto de Fisiología Celular, Unidad de Biología Molecular, UNAM. La evaluación inicial de la calidad y la distribución del tamaño del ADN de los 12 *pools* se realizó en el equipo *TapeStation 2200* (Agilent Technologies) utilizando el *kit DNA Genomic ScreenTape* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Con el valor de la concentración obtenido con el *TapeStation* se hizo la fragmentación enzimática de los *pools* utilizando el *kit Nextera-XT DNA Sample Preparation* (Illumina, San Diego CA, USA). Brevemente, se mezclaron los siguientes reactivos: 5 µl de *Amplicon Tagment Mix*, 10 µl de *Tagment DNA Buffer* y 5 µl de ADN (0.2 ng/µl), se colocó en termociclador a 55 °C durante 5 minutos. Posteriormente, se agregaron 5 µl de *Neutralize Tagment Buffer*. El perfil de fragmentación se analizó en el *TapeStation* utilizando el *kit High-Sensitivity D1000 ScreenTape*. Para la amplificación de las librerías se utilizó el *kit Nextera® XT Index*. Se realizó una mezcla de reacción con: 5 µl de *Index 1 adapters*, 5 µl de *Index 2 adapters*, 15 µl de *Nextera PCR Master Mix* y se colocó en termociclador a 72 °C por 3 minutos, 95 °C por 30 segundos, 12 ciclos de 95 °C por 10 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos y finalmente a 72 °C durante 5 minutos. A continuación se purificó el ADN utilizando perlas magnéticas. Para evaluar el tamaño de los fragmentos y ajustar la concentración a 2 nM, se analizaron las librerías de ADN en el *TapeStation 2200* con el *kit High Sensitivity D1000 ScreenTape*. Por último, se realizó la secuenciación de los 12 *pools* en la plataforma *MiSeq Illumina* con el *kit MiSeq Reagent Kit v3, 150 Cycles* para obtener lecturas pareadas de 150 pb.

### **Análisis bioinformático**

Los análisis de las secuencias de nucleótidos obtenidas fueron realizados en un sistema operativo GNU Linux, en el laboratorio de Ecomedicina Aviar del Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves de la FMVZ-UNAM. Se realizó la edición de las secuencias para eliminar aquellas de baja calidad con el programa *Prinseq* (versión 0.20.4)(Schmieder and Edwards, 2011). También, se eliminaron las secuencias que pertenecían al genoma del huésped usando el genoma de referencia disponible de *Anas platyrhynchos* (GenBank assembly: BGI\_duck\_1.0 [GCA\_000355885.1]) y utilizando *BWA-MEM v0.7.15* (Li and Durbin, 2009). Además, se

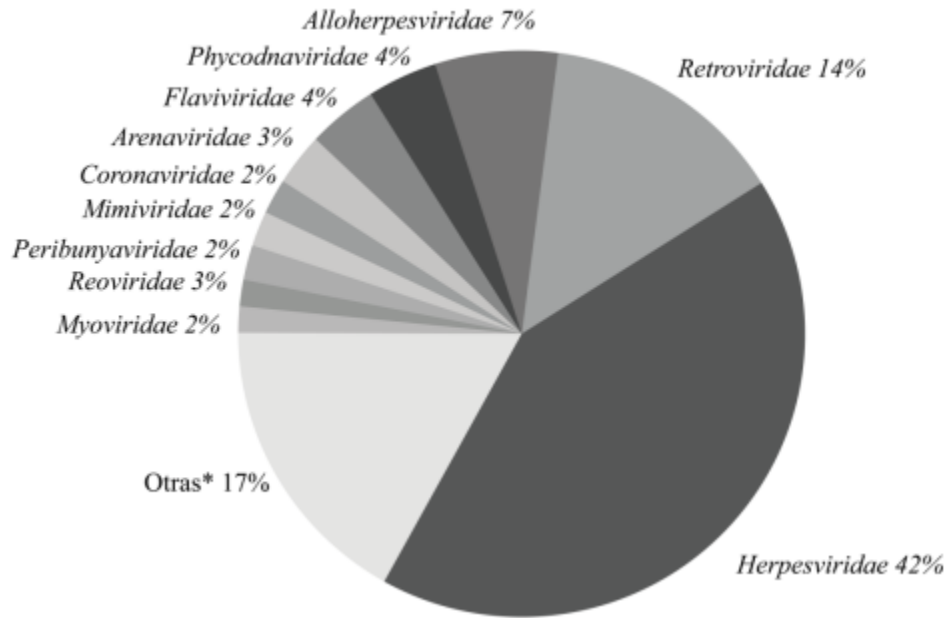
identificaron y eliminaron las secuencias similares a ARN ribosomal utilizando RiboPicker (versión 0.4.3)(Schmieder *et al.*, 2012). Finalmente, las secuencias pertenecientes a bacterias se eliminaron utilizando Kraken (Galaxy Versión 1.2.3) (Wood and Salzberg, 2014).

Las lecturas resultantes se compararon con una base de datos de virus construida con secuencias reportadas en el banco de genes (GenBank en inglés) del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en Inglés) (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>; gbvrl 1-50,). Se utilizó la herramienta bioinformática de búsqueda de alineamiento local (BLAST por sus siglas en Inglés) utilizando el programa Blastn (v2.7.1 +) con un valor E de  $10^{-4}$ . Para la asignación taxonómica, los resultados de la búsqueda en Blastn se analizaron y visualizaron utilizando MEGAN (v6.12.3) (Huson *et al.*, 2016) (lowest common ancestor [LCA] weighted = 80, minimum support = 3, minimum score = 40.0, max expected = 0.0001, top percent = 5.0, min identity = 80). Posteriormente, las secuencias clasificadas como virus se compararon con una base de datos de proteínas virales del NCBI, utilizando Blastx (v2.7.1 +) con un valor E de  $10^{-5}$ . También, para agrupar las secuencias virales según el tipo de hospedero probable que infectan, se buscó la identificación taxonómica de las secuencias en el navegador de taxonomía del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>). Además, cada género y especie viral se confirmó mediante el sitio web del Comité Internacional sobre Taxonomía de Virus (<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>). Finalmente, para estimar la diversidad de la riqueza de especies se calcularon curvas de rarefacción y los índices de Shannon-Weaver a partir de las secuencias asignadas a las familias virales. Para comparar las composiciones virales, se construyó una matriz de disimilitud de Bray-Curtis basada en la abundancia de familias virales, y se realizó un análisis de coordenadas principales de la matriz de Bray-Curtis con MEGAN.



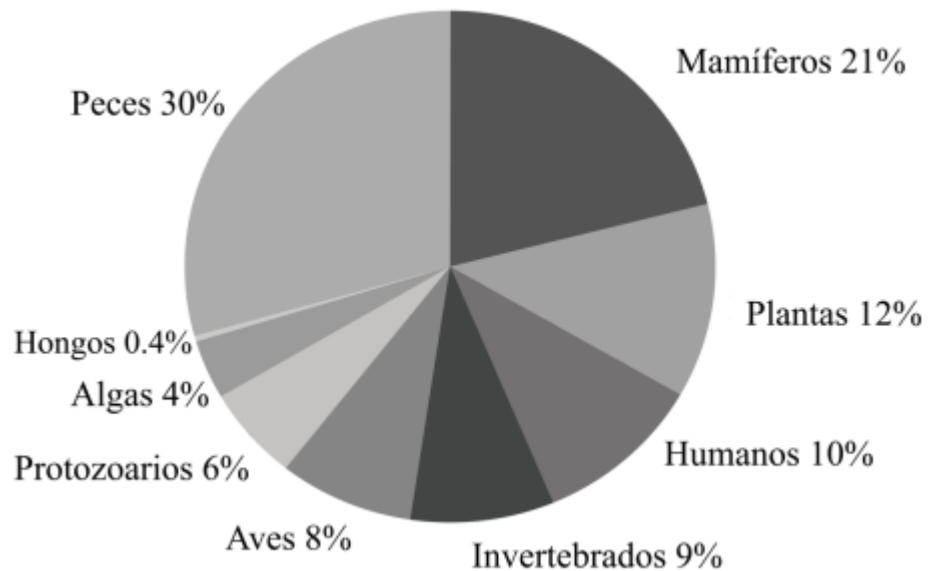
## VII. RESULTADOS

Se obtuvieron 3,133,053 de lecturas con la plataforma *Ion PGM* (> 20 Phred Quality score), que se enviaron a la base de datos del NCBI (BioProject PRJNA369683, SRA accession SRP099042). La clasificación taxonómica asignó 3,761 lecturas al taxón viral. Una gran mayoría de las lecturas correspondieron a las familias virales *Herpesviridae*, *Retroviridae*, *Alloherpesviridae*, *Phycodnaviridae* y *Flaviviridae*, y el resto de las secuencias se identificaron dentro de diferentes familias de ARN y ADN (Figura 5). Sin embargo, el 3% de las lecturas identificadas como virus no se pudieron asignar a una familia conocida. Del total de lecturas clasificadas 74% (5,101) fueron virus de ADN y 26% (1,758) fueron virus de ARN. El 95% de las lecturas clasificadas pertenecen a virus de eucariotas y el 5% a virus de organismos procariontes. Estos últimos están representados por las familias *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae*, *Microviridae* y *Ackermannviridae* que infectan a bacterias. El tipo de hospedero se identificó en el 93% de las lecturas asignadas a una familia conocida. La clasificación por tipo de hospedero probable de los virus de eucariotas se muestra en la Figura 6. Veintinueve por ciento de las secuencias asignadas a taxones de virus en las heces de patos silvestres pertenecen a virus de peces de la familia *Alloherpesviridae*, de los géneros *Cyprinivirus* e *Ictalurivirus*. Además, el 21% y el 10% de las secuencias de virus eucariotas pertenecen a virus de mamíferos y humanos, respectivamente, y se identificaron familias como *Poxviridae*, *Herpesviridae*, *Papillomaviridae* y *Adenoviridae*. Los virus de plantas también se identificaron con un 12% en las heces de los patos silvestres, y siete familias virales fueron identificadas. El 9% de las lecturas asignadas a virus eucariotas pertenecían a insectos agrupadas en 14 familias virales. Las lecturas que pertenecen a virus de protozoos, algas y hongos se identificaron en porcentajes bajos, 6%, 4% y 0,4%, respectivamente, y solo se identificaron las familias *Mimiviridae*, *Phycodnaviridae*, *Totiviridae* e *Hypoviridae*.



**Figura 5. Clasificación taxonómica de las secuencias obtenidas con la plataforma *Ion Torrent*.** Las lecturas se compararon con la base de datos de virus del GenBank utilizando Blastn.

\*Otras representa el resto de las familias virales con <1% de representatividad.



**Figura 6. Porcentaje de virus eucariotas ordenados por tipo de hospedero.** La identificación taxonómica de las secuencias obtenidas con la plataforma *Ion Torrent* y que fueron clasificadas se buscó en el sitio web del NCBI.

Con la secuenciación en la plataforma *MySeq* se obtuvieron un total de 47,352,370 lecturas con una calidad > 30 (*Phred score*). Las secuencias se enviaron a la base de datos del NCBI (*BioProject accession*: PRJNA449682, *Sequence Read Archive accession*: SRP140672). Los resultados de la búsqueda Blastn y la clasificación taxonómica utilizando MEGAN se resumen en el Cuadro 2. En general, las familias *Herpesviridae*, *Alloherpesviridae*, *Adenoviridae*, *Retroviridae* y *Myoviridae* presentaron las mayores abundancias en las especies de patos (Figura 7). Las secuencias virales de ADN y ARN representaron el 95% y el 5% del material genético viral, respectivamente, y las secuencias virales relacionadas con eucariotas y los fagos representaron el 59% y el 41% del material total, respectivamente.

**Cuadro 2. Secuencias clasificadas al taxón viral.** Se muestran los resultados de la búsqueda Blastn de lecturas clasificadas como virus utilizando la base de datos de virus del GenBank.

<i>Pool</i> <sup>a</sup>	Especie de pato	Secuencias <i>Illumina</i> (>30Q)	Secuencias filtradas <sup>b</sup>	Secuencias de virus	Índice Shannon-Weaver <sup>c</sup>
1	<i>A. acuta</i>	1,807,765	310,129	77,895	1.1
2	<i>M. americana</i> (I)	2,412,921	109,057	43,050	3.1
3	<i>M. americana</i> (II)	1,101,466	134,664	57,393	3.3
4	<i>S. clypeata</i> (I)	1,691,373	198,205	91,099	0.9
5	<i>S. clypeata</i> (II)	1,586,935	118,611	87,019	1.8
6	<i>S. clypeata</i> (III)	2,056,522	341,458	128,390	1
7	<i>S. cyanoptera</i>	1,966,114	397,044	113,774	1
8	<i>S. discors</i>	2,467,922	288,267	158,928	3.1
9	<i>M. strepera</i> (I)	1,695,263	154,071	95,543	3.4
10	<i>M. strepera</i> (II)	1,745,842	216,957	210,070	3.7
11	<i>O. jamaicensis</i> (I) <sup>d</sup>	1,762,231	111,142	30,371	3.3
12	<i>O. jamaicensis</i> (II) <sup>d</sup>	2,051,149	83,249	21,835	3.6

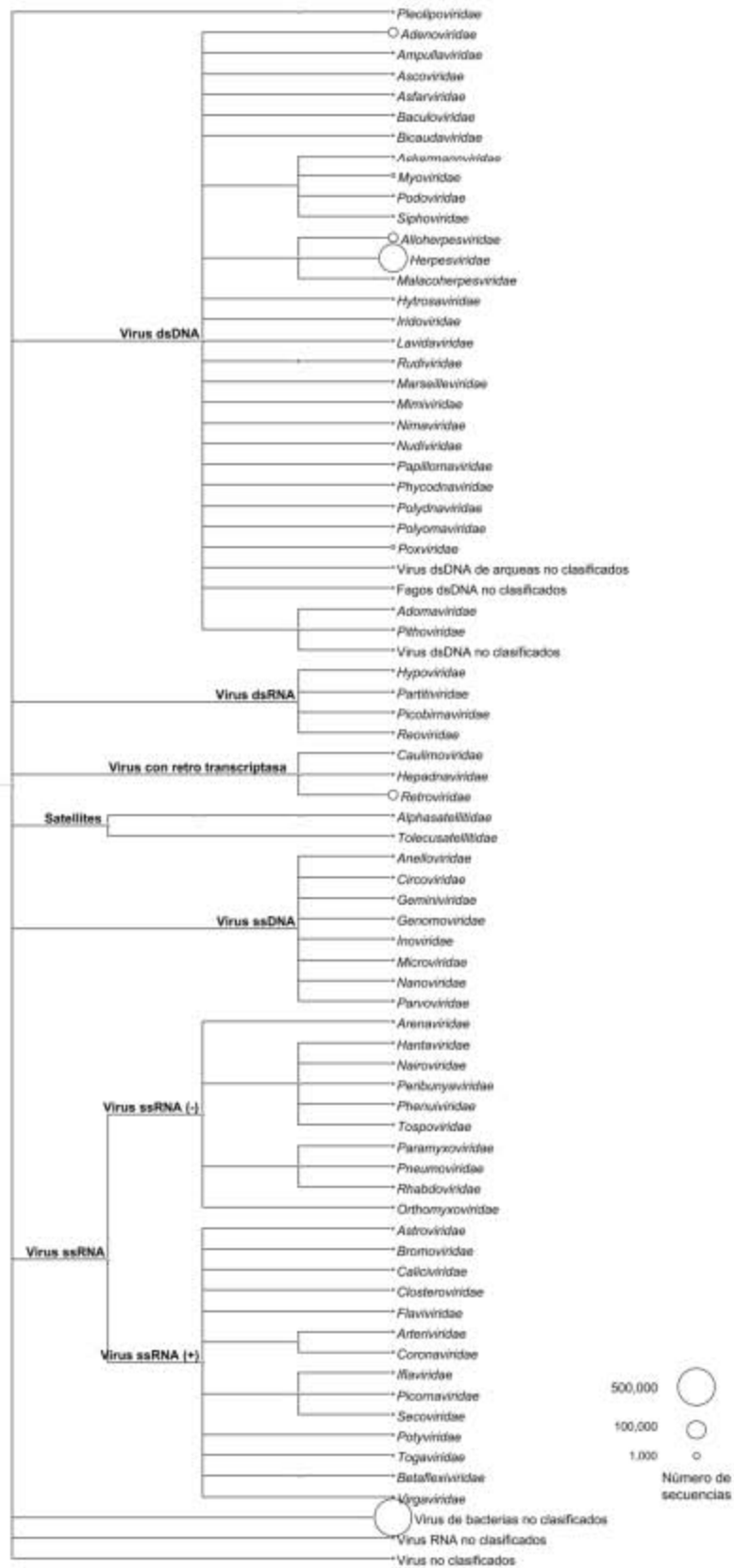
El número entre paréntesis representa un *pool* diferente de la misma especie con diferentes individuos.

<sup>a</sup> Cada *pool* incluye cinco individuos de la misma especie.

<sup>b</sup> Secuencias del genoma del hospedero y de bacterias.

<sup>c</sup> Índices calculados a nivel de familia viral utilizando secuencias normalizadas.

<sup>d</sup> Especies de patos buceadores.



**Figura 7. Abundancia general de familias virales identificadas en patos silvestres.** Con los datos obtenidos de la búsqueda Blastn de las secuencias obtenidas de la plataforma *Illumina*, se construyó un árbol de LCA. Los resultados fueron analizados y visualizados utilizando MEGAN. Los tamaños de los círculos corresponden a las abundancias de las lecturas totales en los 12 *pools*.

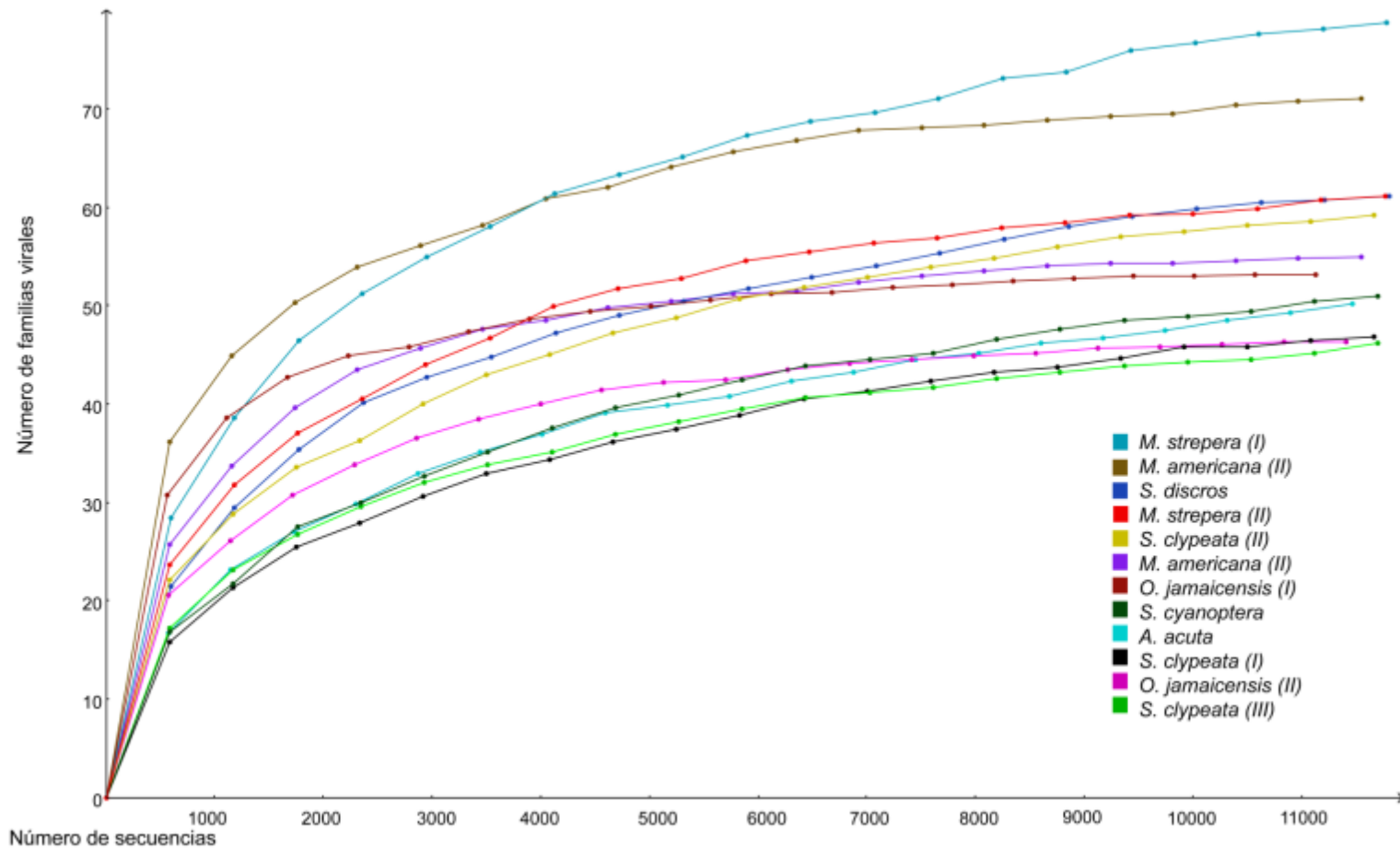
Las especies de virus identificadas por Blastx de las principales familias virales en las muestras de heces de patos silvestres se muestran en el Cuadro 3. Se encontraron secuencias virales relacionadas con aves, humanos, bacterias y peces. Además, también se identificaron más de 146 especies de virus relacionados con vertebrados, insectos, bacterias y plantas (Anexo 2).

**Cuadro 3. Especies de virus de las principales familias identificadas en heces de patos silvestres.**

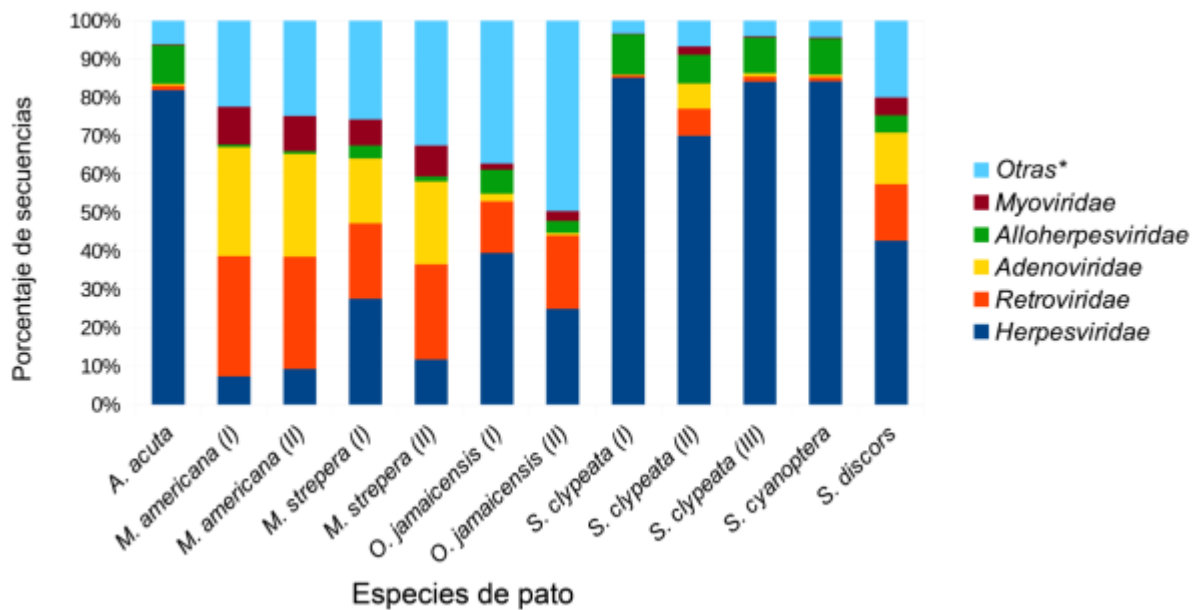
<b>Familia</b>	<b>Especies</b>
<i>Myoviridae</i>	<i>Escherichia virus P1</i>
<i>Alloherpesviridae</i>	<i>Cyprinid herpesvirus 1</i>
<i>Herpesviridae</i>	<i>Columbid alphaherpesvirus 1</i>
	<i>Human betaherpesvirus 5</i>
<i>Retroviridae</i>	<i>Avian leukosis virus</i>
	<i>Reticuloendotheliosis virus</i>

Las curvas de rarefacción de todos los *pools* tendieron a una asíntota horizontal (Figura 8), esto indica que la mayoría de las familias virales se habían medido. La riqueza estimada entre las especies fue heterogénea: el número más bajo de 0.9 se obtuvo para la especie *S. clypeata* y el número más alto de 3.7 para la especie *M. strepera*. Las muestras de la misma especie tenían una riqueza viral similar. Las comparaciones de las secuencias asignadas a las familias virales en las diferentes especies de patos silvestres se representan en la Figura 9. Las abundancias relativas de las principales familias virales identificadas (*Herpesviridae*, *Adenoviridae*, *Retroviridae*, *Alloherpesviridae* y *Myoviridae*) mostraron diferencias entre las especies de patos. La familia más representada en el grupo de muestras fue *Herpesviridae*, que tuvo una abundancia de hasta el 85%. Sin embargo, el porcentaje osciló entre ~7 y 85%. Las familias *Retroviridae* y *Adenoviridae* tuvieron una abundancia de 1-31% y ~0.5-28% respectivamente. El porcentaje de la familia *Myoviridae* en la especie *M. americana* y *M. strepera* osciló entre ~7% y 10%, y en la especie *S. clypeata*, *S. cyanoptera*, *S. discors*, *A. acuta* y *O. jamaicensis* fue < 5%. La abundancia de la

familia *Alloherpesviridae* fue de 1 a 11%, y el resto de las familias virales que representaron <1% oscilaron entre 5 y 50%.



**Figura 8. Curvas de rarefacción de los *pools* de heces de patos silvestres.** Las curvas se crearon con MEGAN utilizando los resultados de la búsqueda Blastn de las secuencias obtenidas en la plataforma *Illumina* y asignadas a una familia viral

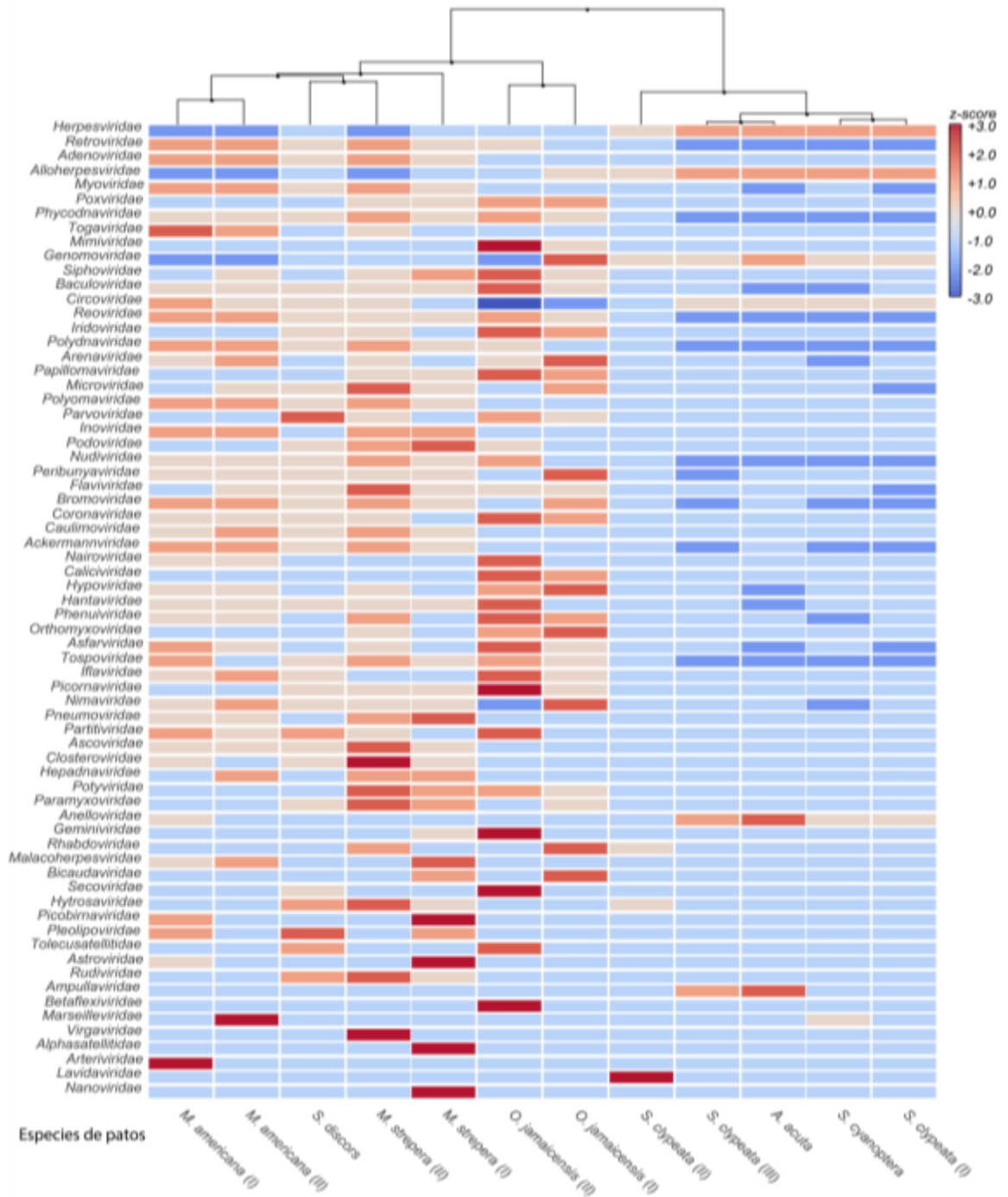


**Figura 9. Comparación de las principales familias virales identificadas en las especies de patos silvestres.** Las lecturas de la búsqueda Blastn se normalizaron y analizaron con MEGAN. \*

El término “Otras” representa el resto de las familias virales identificadas (63) que no se mostraron en la figura y tenían una abundancia <1%.

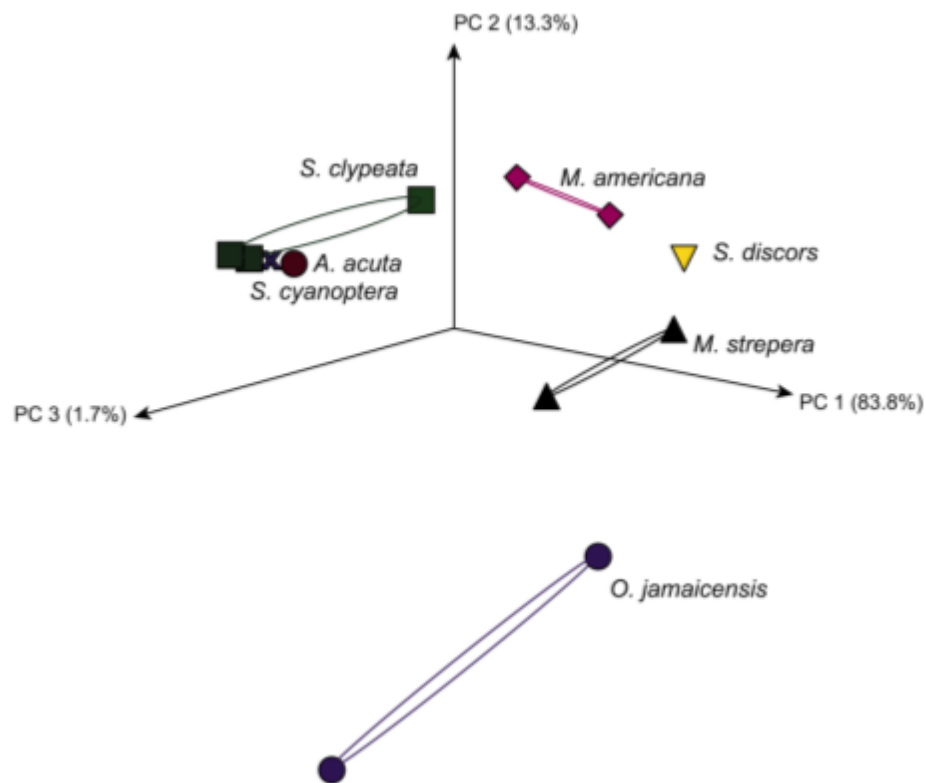
En la Figura 10 se presenta un mapa de calor de las abundancias relativas de todas las familias virales identificadas en las diferentes especies de patos. Las especies de pato se agruparon en dos clados en el dendrograma de acuerdo con las similitudes en las abundancias de las familias virales identificadas. Las especies agrupadas en el clado derecho del dendrograma exhibieron abundancias más bajas (azul) en la mayoría de las familias. Las especies de pato *A. acuta* y *S. clypeata* (III) compartieron una composición similar con poca abundancia de la mayoría de las familias virales, y las muestras de las especies *S. clypeata* (I) y *S. cyanoptera* también mostraron una composición similar. El grupo de *S. clypeata* (II) se agrupó en un sub clado diferente de las otras especies. En el clado izquierdo, las especies *O. jamaicensis* (patos buceadores) se agruparon en un sub clado diferente de la especie del clado izquierdo. Las especies *O. jamaicensis* tuvieron una mayor abundancia (rojo) de la mayoría de las familias en comparación con las otras especies. En dos grupos de *M. americana*, se observaron composiciones muy similares, y la abundancia de la mayoría de las familias virales fue muy homogénea, es decir, ninguna familia particular fue dominante. Se observó una composición similar en los grupos de *S. discors* y *M. strepera* (II), pero se encontró una abundancia diferente en el *pool* I de *M. strepera*, lo que resultó en que se agrupara en un sub clado diferente.





**Figura 10. Mapa de calor que muestra las abundancias relativas de las familias virales.** Se muestran las abundancias relativas de las familias virales encontradas en patos silvestres según las coincidencias de Blastn. Las lecturas fueron normalizadas, analizadas y visualizadas con MEGAN. El código de colores indica las abundancias relativas a la media (el rojo muestra una gran abundancia y el azul indica una baja abundancia).

Se realizó un análisis de coordenadas principales para visualizar los patrones de agrupamiento de las muestras. Este análisis reveló que las composiciones del viroma se agruparon según las especies de patos silvestres. Como se ilustra en la Figura 11, el 83% de la variación observada fue en componente 1, y las especies de *M. americana*, *M. strepera* y *S. discors* exhibieron patrones similares de diversidad y se agruparon juntos. Las especies *A. acuta* y *S. cyanoptera* tenían un patrón de agrupamiento ligeramente similar y se agruparon cerca de la especie *S. clypeata*. Las especies *O. jamaicensis* se agruparon lejos de las otras.



**Figura 11. Análisis de coordenadas principales de las composiciones del viroma de patos silvestres.** El análisis se basó en una matriz de disimilitud Bray-Curtis que se construyó con MEGAN utilizando lecturas normalizadas. Las especies de patos están representadas por figuras de colores. Las variaciones explicadas por los componentes se indican entre paréntesis en los ejes.

## VIII. DISCUSIÓN

Este es el primer estudio que describe la diversidad viral en heces de patos silvestres migratorios durante su estancia de otoño-inverno en un ambiente acuático en México. También, establece una descripción inicial del viroma en distintas especies de patos silvestres. El análisis de la comunidad intestinal de patos mostró una gran diversidad viral y una variedad de familias de virus de organismos eucarióticos y procarióticos. Además, una mayor abundancia de virus ADN (74% y 95%) que de virus ARN (26% y 5%) en los dos muestreos. En este estudio, los virus de eucariotas fueron los más abundantes (95% y 59%). Además, se identificaron secuencias relacionadas con virus bacterianos no clasificados (41%). Los porcentajes de fagos encontrados en patos de vida libre y de granja en otros estudios, oscilan entre 1 y 77%, y los virus de eucariotas entre 33 y 99% (Fawaz *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2018). La región geográfica, el tiempo de recolección de las muestra y el entorno natural de los patos silvestres podrían explicar las diferencias en las proporciones de virus ADN y ARN y de fagos. Es necesario confirmar que las poblaciones de virus de organismos eucariotas, a diferencia de los fagos, son las principales en las heces de los patos silvestres.

El análisis del viroma de heces de patos silvestres reveló una compleja diversidad de virus relacionados con vertebrados, insectos, bacterias y plantas. El 92% de los virus eucarióticos encontrados en este estudio, no se relacionaron con las aves, sino con otros hospedadores como peces, mamíferos, plantas, hongos, algas, protozoarios e invertebrados. Con la técnica de secuenciación masiva, otros estudios también han identificado una gran proporción de virus diferentes a los de los hospedadores naturales. En muestras de cloaca de patos de granja el 99% del total de virus eucarióticos identificados tenían relación con insectos, algas, protozoarios, mamíferos y plantas (Fawaz *et al.*, 2016). Además, las poblaciones de virus en las heces de murciélagos de EE. UU., contienen entre 70 y 95% de virus de insectos y plantas (Li *et al.*, 2010), mientras que en muestras de murciélagos en China, el porcentaje fue del 89% (Ge *et al.*, 2012). En otras especies, los virus pertenecientes a insectos, plantas o peces tuvieron bajas proporciones o no fueron identificados. Como ejemplo, solo 39% de virus de insectos y 3.4% de virus de plantas se identificaron en heces de roedores silvestres (Phan *et al.*, 2011). En gatos de un refugio de animales, Zhang *et al.* (2014) identificaron virus de plantas, insectos y peces en 1.2%, 0.2% y 0.2%, respectivamente. En granjas de cerdos de traspatio en África, solo el 14% de

los virus identificados en las heces fueron virus de plantas (Amimo *et al.*, 2016). Las diferencias en las comunidades virales de las heces de distintas especies pueden atribuirse a sus nichos ecológicos específicos y a sus dietas. En patos silvestres, estos virus pueden encontrarse en el ecosistema acuático infectando plantas, insectos y otros organismos acuáticos. Sin embargo, la presencia de estos virus debe confirmarse tanto en el humedal como en los patos silvestres en diferentes épocas del año.

Se encontraron secuencias pertenecientes a la familia *Herpesviridae* y especies como *Columbid alphaherpesvirus 1*, este virus está asociado con enfermedades en palomas, búhos y halcones (Callinan *et al.*, 1979; Gailbreath and Oaks, 2008). También, se identificó la especie *Human betaherpesvirus 5*, este es un herpesvirus ubicuo que causa infecciones generalmente asintomáticas o autolimitantes en adultos sanos, e infección congénita en recién nacidos (Britt and Prichard, 2018). La familia *Herpesviridae* se ha detectado previamente en muestras de agua dulce (Mohiuddin and Schellhorn, 2015) y en el viroma fecal de especies como los murciélagos (Geldenhuys *et al.*, 2018; Salmier *et al.*, 2017), roedores silvestres (Phan *et al.*, 2011) y patos domésticos (Fawaz *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2018). Sin embargo, ninguna especie de virus perteneciente a esta familia ha sido reportada previamente en el viroma de patos, y la abundancia de esta familia en patos domésticos fue menor que la obtenida en este estudio. Las seis familias de fagos identificadas en este estudio (*Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae* e *Inoviridae*, *Microviridae* y *Ackermannviridae*), coinciden con las reportadas previamente en patos domésticos (Fawaz *et al.*, 2016; Zhao *et al.*, 2018). En este estudio, se detectaron adenovirus en todas las especies de patos silvestres examinadas, sin embargo, no se pudo identificar ninguna especie de virus por Blastx. Esta familia se ha detectado en el viroma intestinal mediante secuenciación masiva en muestras de patos domésticos (Zhao *et al.*, 2018), pollos de producción (Lima *et al.*, 2017) y murciélagos (Hu *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2010). Las especies de virus identificadas de la familia *Retroviridae* están asociadas con enfermedades infecciosas en aves de corral. El *Virus de la leucosis aviar* y otros virus del grupo leucosis/sarcoma inducen una amplia gama de afecciones neoplásicas y causan pérdidas económicas significativas (Fadly, 2000; Nair and Fadly, 2013). La infección por el *Virus de la reticuloendoteliosis* es común en las producciones de pollos, pavos y patos, e induce retraso en el crecimiento, inmunodepresión y linfomas crónicos (Nair *et al.*, 2013). Además, estos virus se han reportado en patos silvestres (Li *et al.*, 2013; Zeng *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2014).

Se identificaron virus relacionados con la familia *Alloherpesviridae*, dentro de esta familia, las especies de virus del género *Cyprinivirus* están asociadas con enfermedades hemorrágicas en peces (Gotesman *et al.*, 2013; Siti-Zahrah *et al.*, 2014). Los virus relacionados con peces se han reportado previamente en patos domésticos (Fawaz *et al.*, 2016), pero el estudio anterior no mencionó familias o especies. Además, identificamos 22 familias que no se habían detectado previamente en muestras fecales de patos silvestres y 36 familias virales que se habían reportado previamente en otros estudios de muestras fecales o cloacales de patos (Fawaz *et al.*, 2016; Qiu *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2018). Por lo tanto, los virus relevantes en medicina veterinaria que posiblemente sean diseminados por patos silvestres deben ser monitoreados. Además, el posible papel de los patos silvestres que albergan virus humanos debe ser estudiado más a fondo. La presencia de estos virus relacionados con organismos vertebrados en patos clínicamente sanos no se ha estudiado completamente: es posible que estos virus asociados con patos estén infectando persistentemente a estas aves. Por otro lado, los patos podrían estar acarreando virus presentes en ambientes impactados por actividades humanas como la ganadería, pesca y el desecho de aguas residuales. Además, los virus relacionados con los organismos procariotas podrían estar infectando a las bacterias presentes en el intestino de los patos o en el ecosistema acuático.

Existen familias virales que se identificaron en todas las especies de patos analizados. Sin embargo, el análisis del mapa de calor mostró diferencias en la abundancia de familias virales entre especies y entre muestras de las mismas especies de patos silvestres. Es esperado encontrar similitudes en las comunidades de virus intestinales de los patos, ya que comparten un ecosistema y se ha sugerido que el ambiente influye en las composiciones del viroma en individuos que comparten hábitats (Robles-Sikisaka *et al.*, 2013). Las diferencias en la abundancia viral podrían explicarse por factores como la edad, la dieta y las variaciones individuales. Los resultados revelaron que la especie *O. jamaicensis* tuvo la mayor abundancia de familias virales y exhibió altos índices de riqueza de especies. Estos patos se consideran buceadores porque se alimentan de organismos acuáticos, semillas y vegetación del fondo del agua, mientras que las otras especies en este estudio son patos que normalmente se alimentan en la superficie o en aguas poco profundas, aunque también pueden pastar en los campos (Drilling *et al.*, 2002). Los hábitos de alimentación de los patos buceadores y de superficie podrían explicar las diferencias en los perfiles del viroma intestinal. Aunque no está demostrado que la dieta influya en la composición del viroma en aves silvestres, hay estudios que sugieren que el comportamiento de alimentación

determina la estructura del viroma en especies de murciélagos (Salmier *et al.*, 2017). Además, encontramos variaciones en el viroma entre las especies, y esta característica se ha documentado en tres especies diferentes de murciélagos (Donaldson *et al.*, 2010). Por lo tanto, las diferencias en las comunidades virales de las heces de los patos silvestres pueden atribuirse a sus nichos ecológicos específicos y a sus dietas.

El análisis de coordenadas mostró patrones similares en la estructura del viroma, pero también diferencias entre las especies de patos silvestres. Estudios anteriores han indicado la existencia de variabilidad interpersonal en la composición del viroma de humanos y patos domésticos (Minot *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2018). Esta variabilidad podría explicarse por múltiples factores, como las diferencias en las edades de los animales o en los niveles de respuestas inmunitarias. En pollos, humanos y cerdos, la comunidad viral intestinal cambia según la edad (Shah *et al.*, 2016; Sachsenröder *et al.*, 2014). Aunque las variaciones en la abundancia viral que están vinculadas a la edad no se han demostrado en patos silvestres, existe información sobre la susceptibilidad de patos silvestres más jóvenes a virus específicos, y esta susceptibilidad es el resultado de un sistema inmune inmaduro (Stallknecht and Shane, 1988). También debemos considerar las posibles interacciones entre los virus como un factor que puede alterar la respuesta inmune o la capacidad de infección de un patógeno que no está relacionado con la comunidad intestinal (es decir, la inmunidad heteróloga) (Welsh *et al.*, 2010). Aun no se ha demostrado que la infección con algún virus puede alterar la estructura del viroma, pero se ha señalado que la infección individual con un virus puede mejorar la respuesta inmune contra un virus diferente en ratones sanos infectados experimentalmente (Furman *et al.*, 2015). Asimismo, Ganz *et al.* (2017) sugirieron que la infección con un virus específico puede alterar el bacterioma en patos silvestres. Por lo tanto, en el futuro debemos continuar estudiando las interacciones entre los virus y el viroma en las comunidades intestinales de animales clínicamente sanos, y cómo estas interacciones favorecen o evitan brotes de enfermedades infecciosas en animales domésticos. También, debemos explorar los factores bióticos y abióticos que influyen en las variaciones de la abundancia relativa de virus entre diferentes especies de pato.

## **IX. CONCLUSIONES**

La mayoría de los virus identificados en este estudio fueron consistentes con los de un ambiente acuático, pero es esencial considerar la posible contaminación de los humedales por virus de otros organismos. La abundancia relativa de virus en diferentes especies de patos silvestres que comparten el mismo hábitat es diversa. El papel de los nuevos virus que podrían encontrarse en el intestino de los patos silvestres no se comprende completamente, y suponemos que estos virus probablemente habitan el medio ambiente y que su aparición depende de ciertas condiciones en cada ecosistema, como el impacto antropogénico por las actividades de agricultura y ganadería. Se necesita continuar estudiando los virus que albergan los patos silvestres migratorios para monitorear un potencial riesgo zoonótico o brotes en animales domésticos. Además, se deben esclarecer los factores que determinan la composición de los viomas de diferentes especies de patos silvestres y su influencia en aves domésticas.

## **X. ANEXO 1**



RESEARCH ARTICLE

# Fecal virome composition of migratory wild duck species

Luis Alfonso Ramírez-Martínez<sup>1</sup>, Elizabeth Loza-Rubio<sup>2</sup>, Juan Mosqueda<sup>3</sup>, Manuel Leonardo González-Garay<sup>4</sup>, Gary García-Espinosa<sup>1\*</sup>

**1** Departamento de Medicina y Zootecnia de Aves, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México, **2** Departamento de Biotecnología en Salud Animal, Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Microbiología Animal, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, (CENID-Microbiología-INIFAP), Ciudad de México, México, **3** Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro, Querétaro, Querétaro, México, **4** Department of Medicine, Center for Biomedical Informatics & Biostatistics, The University of Arizona, Tucson, Arizona, United States of America

\* [gary@unam.mx](mailto:gary@unam.mx)



**OPEN ACCESS**

**Citation:** Ramírez-Martínez LA, Loza-Rubio E, Mosqueda J, González-Garay ML, García-Espinosa G (2018) Fecal virome composition of migratory wild duck species. PLoS ONE 13(11): e0206970. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206970>

**Editor:** Sibnarayan Datta, Defence Research Laboratory, INDIA

**Received:** June 8, 2018

**Accepted:** October 23, 2018

**Published:** November 21, 2018

**Copyright:** © 2018 Ramírez-Martínez et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All raw sequences files are available from the NCBI database (Bioproject accession no. PRJNA449682 and Sequence Read Archive accession no. SRP140672).

**Funding:** This study was financed by Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) number 218716. Luis A. Ramírez Martínez received a scholarship from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología with registration number 423802. The funders had no role in study design, data collection and analysis,

## Abstract

The fecal virome comprises a complex diversity of eukaryotic viruses, phages and viruses that infect the host. However, little is known about the intestinal community of viruses that is present in wild waterfowl, and the structure of this community in wild ducks has not yet been studied. The fecal virome compositions of six species of wild dabbling ducks and one species of wild diving duck were thus analyzed. Fecal samples were collected directly from the rectums of 60 ducks donated by hunters. DNA and RNA virus particles were purified and sequenced using the MiSeq Illumina platform. The reads obtained from the sequencing were analyzed and compared with sequences in the GenBank database. Viral-related sequences from the *Herpesviridae*, *Alloherpesviridae*, *Adenoviridae*, *Retroviridae* and *Myoviridae* viral families showed the highest overall abundances in the samples. The virome analysis identified viruses that had not been found in wild duck feces and revealed distinct virome profiles between different species and between samples of the same species. This study increases our understanding of viruses in wild ducks as possible viral reservoirs and provides a basis for further studying and monitoring the transmission of viruses from wild animals to humans and disease outbreaks in domestic animals.

## Introduction

The microbiome in vertebrates consists of multiple microorganisms that include bacteria, fungi, archaea and viruses. The bacterial community has been widely studied, and the results have revealed that this community contributes to the health status of the host and establishes a symbiotic or commensalistic relationship with the host [1, 2]. The virome, which forms part of the microbiome, is the viral component that includes eukaryotic viruses, bacteriophages, viruses that infect host organisms and genetic elements of the virus in the host genome [3]. This viral component includes pathogenic viruses implicated in host diseases, and recent years have seen increased interest in the interactions of this component with the host and other

decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

elements of the microbiome, persistent viruses and the effects on immunomodulation and susceptibility to diseases [4–6]. Moreover, a specific-host virome profile has been suggested, but this profile can be modified by endogenous and exogenous factors [7]. In particular, factors such as age, drugs, diet and infections could have effects on the virome composition, as has been observed in chickens, pigs and humans [8–10]. However, the structure of the fecal virome in wild ducks has not been researched.

Ducks are the most abundant birds of the *Anatidae* family, and more than 20 species arrive every year at the high plateau, Pacific coast and wetlands of the Gulf of Mexico during the autumn-winter season [11]. Ducks can be generally divided into dabbling and diving ducks based on their feeding behavior in water, and different species of resident or migratory ducks commonly share habitats and nests [12]. In addition, migratory ducks play an important role as reservoirs and disseminators of *Influenzavirus A* and *Avulavirus* [13], and avian influenza viruses (H5 and H7) are occasionally transmitted from wild aquatic birds to domestic poultry and humans [14]. Additionally, differences in susceptibility to these viruses between species of wild ducks have been detected [15, 16], and the viral diversity in the feces of wild migratory ducks and the viruses carried by these birds from the aquatic ecosystem have not been fully described. Moreover, whether the virome structures in the gut of different species of wild ducks are similar or varied requires further analysis. The study of viruses in natural habitats of wild populations could provide a better understanding of the outbreaks of new infectious diseases in domestic animals and humans. Thus, the objective of this study was to characterize the virome compositions of six different species of wild dabbling ducks and one species of diving duck during their wintering stayover in a natural wetland to elucidate the viruses harbored by these birds.

## Materials and methods

### Wetland location

This study was conducted in the northern wetland at the Ciénegas of Lerma in the central high plateau of Mexico. This area is listed as a RAMSAR site of International Importance [17]. The wetland is located in the State of Mexico within the Municipality of Lerma (19° 21' 21.8" N, 99° 31' 00.5" W) and is a stopover site for migratory wild ducks from North America during the autumn and winter seasons [18]. The area is surrounded by rural areas that are used for agricultural purposes and backyard livestock, such as cattle, poultry, and swine [19].

### Sample collection

Sixty carcasses of clinically healthy wild ducks were donated by hunters during January and February of 2016. These ducks belonged to the following species: blue-winged teal (*Spatula discors*), northern pintail (*Anas acuta*), cinnamon teal (*Spatula cyanoptera*), American wigeon (*Mareca americana*), northern shoveler (*Spatula clypeata*), gadwall (*Mareca strepera*) and ruddy duck (*Oxyura jamaicensis*). The feces were obtained directly from the rectum, immediately placed in individual sterile tubes and subsequently maintained at 4°C until their transport to the laboratory for storage at -75°C. The sample collection in the present study was performed with the ethical approval of the Committee for Animal Experiments at the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Husbandry (SICUAE, number DC-2016/2-3).

### Purification of viral particles (virus-like particles)

Individual fecal samples were diluted 1:10 (w/v) with sterile phosphate-buffered saline (PBS) and homogenized by vortexing. From the 60 stool samples, pools of five samples were

prepared according to the species of duck by transferring approximately 5 ml of each of the five individual and diluted samples into a new plastic tube. The 12 pools obtained were processed according to the methods described by Day *et al.* [20] with some modifications. The pools were centrifuged at  $7000 \times g$  (Heraeus Biofuge Primo R) and  $4^\circ\text{C}$  for 15 minutes to clarify the contents. The supernatants were collected and sequentially filtered with sterile cellulose membranes with pore sizes of  $0.45 \mu\text{m}$  and  $0.22 \mu\text{m}$  (Merck Millipore, USA). The virus-sized particles were then concentrated by ultracentrifugation at  $100,000 \times g$  and  $4^\circ\text{C}$  for 3 hours (Beckman Optima XL-90, SW 40Ti fixed-angle rotor). The obtained pellets were resuspended in  $500 \mu\text{l}$  of Tris-HCL buffer (pH 7.5), and non-particle-protected nucleic acids were removed by digestion as described previously [21]. Briefly,  $100 \mu\text{l}$  of the resuspended pellets was treated with a nuclease cocktail of DNase TURBO (32 U) (Ambion, Vilnius, Lithuania) and RNase Cocktail (2 U) (Ambion, Vilnius, Lithuania) in  $40 \mu\text{l}$  of 1X TURBO DNase buffer. The reaction was incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 60 minutes and then at room temperature for 5 minutes with  $40 \mu\text{l}$  of DNase Inactivator. The RNA and DNA nucleic acids were purified according to Ullmann *et al.* [22] using a commercial kit (QIAamp MinElute Virus Spin, Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's recommended protocol. The RNA was then quantified using a commercial fluorometer (Qubit 2.0, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) with an RNA Assay kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). First-strand cDNA was then synthesized with random hexamers using the SuperScript First-Strand Synthesis System kit (Invitrogen, CA, USA) with the following mix:  $1 \mu\text{l}$  of dNTP mix (10 mM),  $1 \mu\text{l}$  of random hexamers (50 ng/ $\mu\text{l}$ ),  $7 \mu\text{l}$  of RNA and  $10 \mu\text{l}$  of nuclease-free water. The reaction was incubated at  $65^\circ\text{C}$  for 5 minutes and then at  $4^\circ\text{C}$  for 2 minutes. A mix of  $2 \mu\text{l}$  of 10X RT buffer,  $4 \mu\text{l}$  of  $\text{MgCl}_2$  (25 mM),  $2 \mu\text{l}$  of DTT (0.1 M) and  $1 \mu\text{l}$  of RNaseOUT (40 U/ $\mu\text{l}$ ) was then added, and the resulting mixture was incubated at room temperature for 2 minutes. One microliter of SuperScript III RT (200 U/ $\mu\text{l}$ ) was then added, and the reaction was incubated at room temperature for 10 minutes,  $42^\circ\text{C}$  for 50 minutes and  $70^\circ\text{C}$  for 15 minutes. Second-strand DNA was obtained with Large Fragment of DNA Polymerase I (Klenow fragment, Invitrogen, CA, USA) with the following mix:  $3 \mu\text{l}$  of 10X REact 2 buffer,  $5 \mu\text{l}$  of dNTP mix (10 mM), DNA Polymerase I (2.5U),  $1 \mu\text{l}$  of T4 DNA ligase,  $1 \mu\text{l}$  of RNase H, cDNA (1  $\mu\text{g}$ ) and  $30 \mu\text{l}$  of nuclease-free water. The reaction was incubated for 60 minutes at  $15^\circ\text{C}$ , and double-stranded DNA was then purified with commercial magnetic beads (Agencourt AMPure XP system, Beckman Coulter, USA), quantified by fluorometry using a commercial dsDNA kit (dsDNA High-Sensitive Kit, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and electrophoresed in a 1% agarose gel. These procedures were performed simultaneously for each of the 12 pools.

## Library preparation and sequencing

Library preparation and sequencing were performed at the Instituto de Fisiología Celular, Unidad de Biología Molecular, UNAM. The initial evaluation of the quality and size distribution of the purified DNA was performed with the Agilent 2200 TapeStation using the Agilent Genomic DNA ScreenTape (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The DNA libraries were then constructed using a Nextera-XT DNA Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego CA, USA) and a Nextera XT Index Kit (Illumina) according to the manufacturer's specifications. After the fragmentation and amplification reactions, the DNA libraries were analyzed with the Agilent 2200 TapeStation using the Agilent High-Sensitivity D1000 ScreenTape and Reagents (Agilent Technologies). The 12 indexed libraries were pooled, mixed with a PhiX Control Kit v3 (Illumina) and sequenced using the MiSeq Illumina platform with a MiSeq Reagent Kit (version 3) to obtain 150-bp paired reads.

### Bioinformatics analysis

Raw reads were mapped onto the reference genome of *Anas platyrhynchos* (GenBank assembly: BGI\_duck\_1.0 [GCA\_000355885.1]) using BWA-MEM v0.7.15 [23], and bacterial reads were removed using Kraken (Galaxy Version 1.2.3). The remaining reads were compared to a customized viral database from the NCBI (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>; gbvrl 1–50, accessed July 25<sup>th</sup>, 2018) using BLASTn (v2.7.1+) with an E value of 10<sup>-4</sup>. The BLASTn output was analyzed and visualized using MEGAN (v6.12.3) [24] for the assignments of taxonomic families (LCA weighted = 80, minimum support = 3, minimum score = 40.0, max expected = 0.0001, top percent = 5.0, min identity = 80). Based on BLASTn output, sequences classified as viruses were then compared to a viral protein database constructed with all viral sequences from the NCBI protein database (nr, accessed August 20<sup>th</sup>, 2018) using BLASTx (v2.7.1+) with an E value of 10<sup>-5</sup>. Furthermore, rarefaction curves and Shannon-Weaver indexes (richness) were calculated from the normalized counts (reads were normalized to the smallest sample size) at the family level using MEGAN. To compare the viral compositions, a Bray–Curtis dissimilarity matrix was constructed based on the abundances of viral families, and a principal coordinate analysis of the Bray–Curtis matrix was performed with MEGAN.

### Results

A total of 47,352,370 reads with Phred quality scores > 30 were obtained (NCBI BioProject accession no. PRJNA449682 and Sequence Read Archive accession no. SRP140672). The sequences were filtered by quality, and the host and bacteria sequences were removed. The BLASTn results and the taxonomic classification based on MEGAN are summarized in Table 1.

Overall, the *Herpesviridae*, *Alloherpesviridae*, *Adenoviridae*, *Retroviridae* and *Myoviridae* families showed the highest abundances in the duck species (Fig 1). DNA and RNA viral sequences represented 95% and 5% of the viral genetic material, respectively, and eukaryotic-related viral sequences and phages represented 59% and 41% of the total material, respectively.

**Table 1. Reads assigned to virus taxa.**

Pool sample <sup>a</sup>	Species	Illumina reads (>30Q)	Reads removed <sup>b</sup>	# reads to viral taxa	Shannon-Weaver index <sup>c</sup>
1	<i>A. acuta</i>	1,807,765	310,129	77,895	1.1
2	<i>M. americana</i> (I)	2,412,921	109,057	43,050	3.1
3	<i>M. americana</i> (II)	1,101,466	134,664	57,393	3.3
4	<i>S. clypeata</i> (I)	1,691,373	198,205	91,099	0.9
5	<i>S. clypeata</i> (II)	1,586,935	118,611	87,019	1.8
6	<i>S. clypeata</i> (III)	2,056,522	341,458	128,390	1.0
7	<i>S. cyanoptera</i>	1,966,114	397,044	113,774	1.0
8	<i>S. discors</i>	2,467,922	288,267	158,928	3.1
9	<i>M. strepera</i> (I)	1,695,263	154,071	95,543	3.4
10	<i>M. strepera</i> (II)	1,745,842	216,957	210,070	3.7
11	<i>O. jamaicensis</i> (I) <sup>d</sup>	1,762,231	111,142	30,371	3.3
12	<i>O. jamaicensis</i> (II) <sup>d</sup>	2,051,149	83,249	21,835	3.6

The results of a BLASTn search of reads classified to virus taxa using the GenBank virus database are shown.

The number in parentheses represents a different pool of the same species with different individuals.

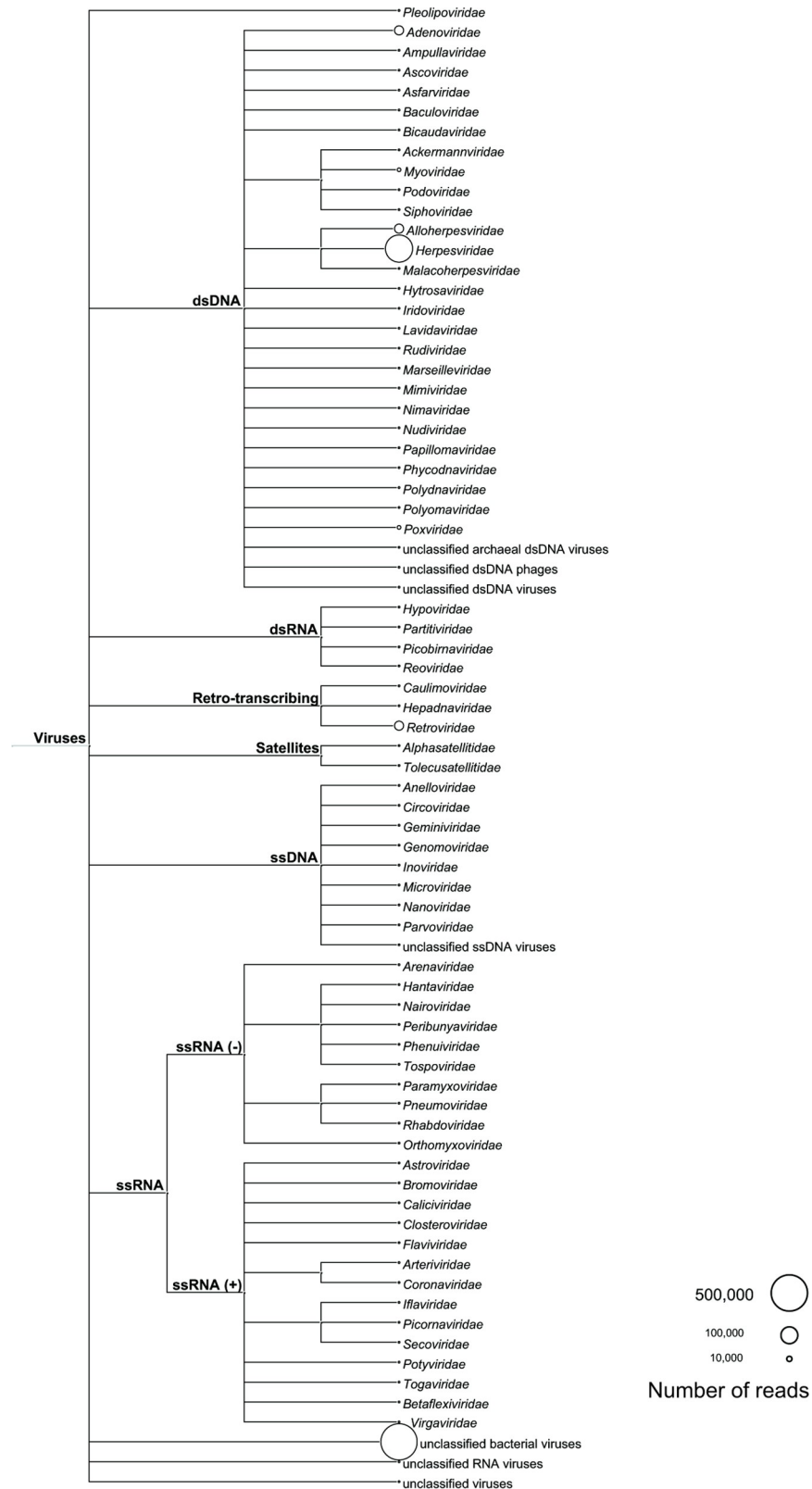
<sup>a</sup> Each pool includes five individuals of the same species.

<sup>b</sup> Reads from host genome and bacteria.

<sup>c</sup> Indexes calculated at family level using normalized reads.

<sup>d</sup> Diving duck species.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206970.t001>



**Fig 1. Overall abundances of viral families identified in wild ducks.** A lowest common ancestor (LCA) tree was constructed based on the data obtained with a BLASTn search. The results were analyzed and visualized using MEGAN. The sizes of the circles correspond to the abundances of the total reads in the 12 sample pools.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206970.g001>

**Table 2. Virus species of the top families identified in feces of wild ducks.**

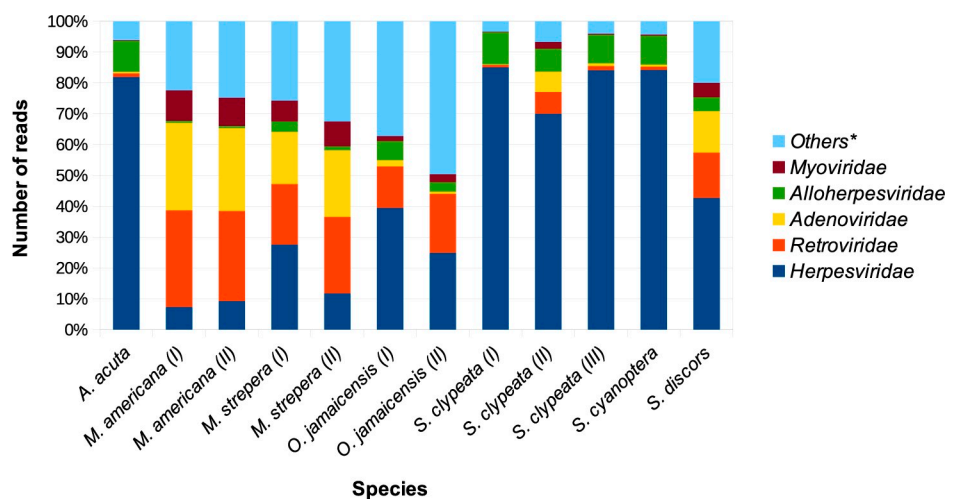
Family	Species
Myoviridae	<i>Escherichia virus P1</i>
Alloherpesviridae	<i>Cyprinid herpesvirus 1</i>
Herpesviridae	<i>Columbid alphaherpesvirus 1</i>
	<i>Human betaherpesvirus 5</i>
Retroviridae	<i>Avian leukosis virus</i>
	<i>Reticuloendotheliosis virus</i>

Sequences classified as viruses were compared to a viral protein database using BLASTx.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206970.t002>

The virus species identified by BLASTx of the top viral families in the samples of wild duck feces are shown in Table 2. Viral sequences related to birds, humans, bacteria and fish were found. Additionally, more than 146 vertebrate-, insect-, bacteria- and plant-related virus species were also identified (S1 Table).

The rarefaction curves of all the samples trended to a horizontal asymptote (S1 Fig), which indicated that most of the viral families had been measured. The estimated richness among the species was heterogeneous: the lowest number of 0.9 was obtained for the species *S. clypeata*, and the highest number of 3.7 for the species *M. strepera*. Samples of the same species had a similar viral richness. The comparisons of the reads assigned to viral families in the different species of wild ducks are represented in Fig 2. The relative abundances of the main identified viral families (*Herpesviridae*, *Adenoviridae*, *Retroviridae*, *Alloherpesviridae* and *Myoviridae*) showed differences among the species of ducks. The most strongly represented family in the group of samples was *Herpesviridae*, which had an abundance of up to 85%. However, the percentage ranged from ~7 to 85%. The *Retroviridae* and *Adenoviridae* families had an abundance of 1–31% and ~0.5–28% respectively. The percentage from the *Myoviridae* family in the species *M. americana* and *M. strepera* ranged from ~7% to 10%, and in the species *S. clypeata*, *S. cyanoptera*, *S. discors*, *A. acuta* and *O. jamaicensis* was <5%. The abundance of the *Alloherpesviridae* family was from 1 to 11%, and the rest of viral families that represented <1% were ranged between 5 to 50%.



**Fig 2. Comparison of top viral families identified in the species of wild ducks.** The reads from the BLASTn search were normalized and analyzed with MEGAN. \*The term “Others” represents the rest of the identified viral families (63) that were not shown in the figure and had an abundance < 1%.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206970.g002>

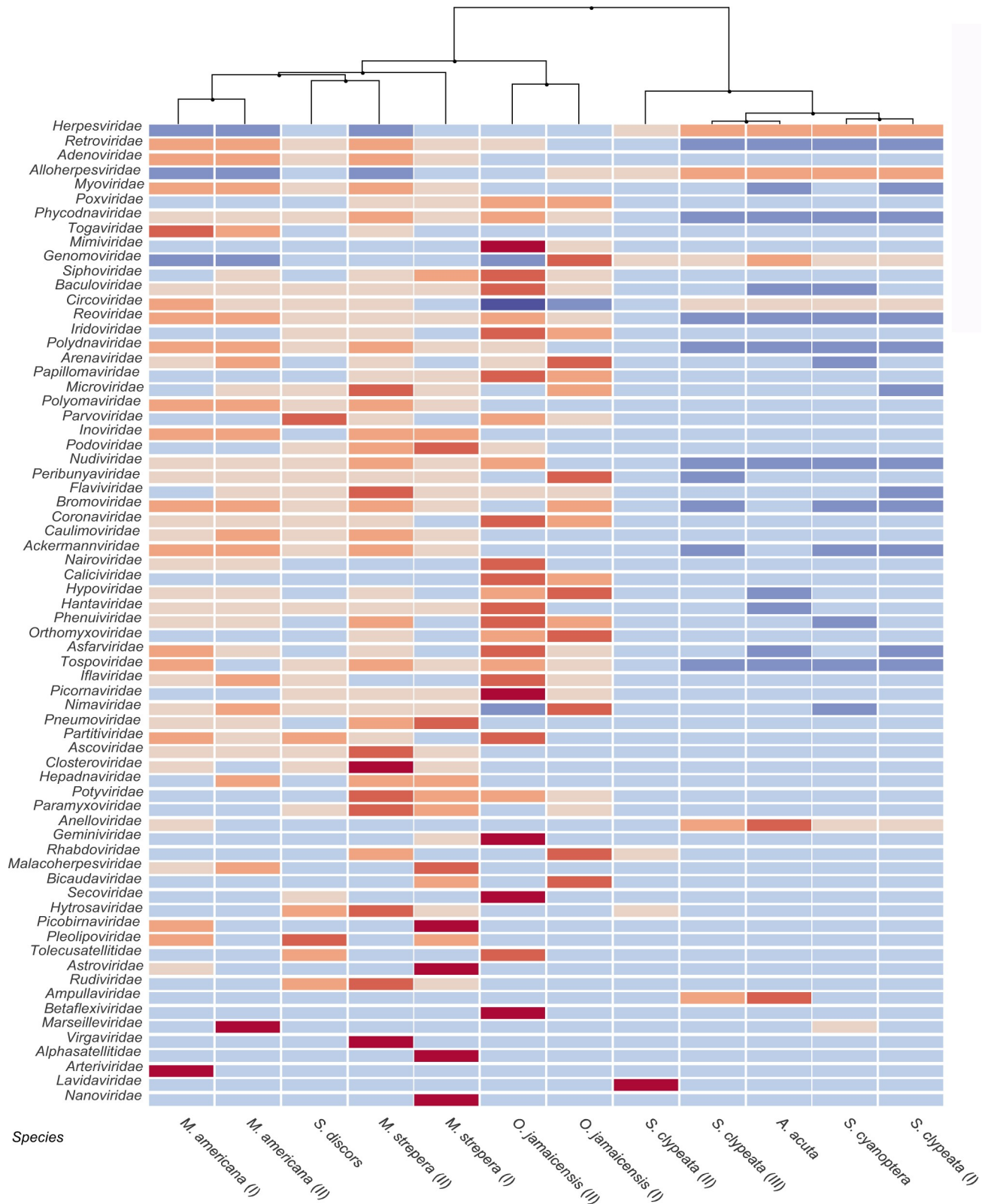
A heatmap of the relative abundances of all the viral families identified in the different species of ducks is presented in Fig 3. The duck species were grouped into two clades in the dendrogram according to similarities in the abundances of the identified viral families. The pools grouped in the right clade of the dendrogram exhibited lower abundances (blue) in most families. The duck species *A. acuta* and *S. clypeata* (III) shared a similar composition with low abundances of most of the viral families, and the samples of the species *S. clypeata* (I) and *S. cyanoptera*, also exhibited a similar composition. The pool of *S. clypeata* (II) was grouped into a different subclade from the other species. In the left clade, the pools of *O. jamaicensis* (diving ducks) were grouped into a different subclade from the left clade species. The *O. jamaicensis* species had greater abundances (red) of most families compared with the other species. In two pools of *M. americana*, very similar compositions were observed, and the abundances of most of the viral families were very homogeneous, i.e., no particular family was dominant. Similar composition was observed in the pools of *S. discors* and *M. strepera* (II), but a different abundance was found in pool I of *M. strepera*, which resulted into it being grouped into a different subclade.

A principal coordinate analysis was performed to visualize the clustering patterns of the samples. This analysis revealed that the virome compositions were clustered according to the species of wild ducks. As illustrated in Fig 4, 83% of the variation observed was in PC 1, and the pools of *M. americana*, *M. strepera* and *S. discors* exhibited similar patterns of diversity and were grouped into clusters. The species *A. acuta* and *S. cyanoptera* had a slightly similar clustering pattern and were grouped closed to the species *S. clypeata*. The pools of the species *O. jamaicensis* were clustered far from other species.

## Discussion

The results obtained in this study extend the knowledge of the intestinal viromes in different species of migratory wild ducks that share the same natural wetland during their winter stay-over. The overall samples presented a greater abundance of DNA viruses than RNA viruses and a higher proportion of eukaryotic viruses than phages. The proportions of DNA compared with RNA viruses were different from those obtained in a previous study of domestic waterfowl. Zhao *et al.* [25] found a higher percentage of RNA and eukaryotic viruses in the feces of domestic ducks, whereas Fawaz *et al.* [26] reported a higher proportion of phages and DNA viruses in cloaca samples from domestic ducks.

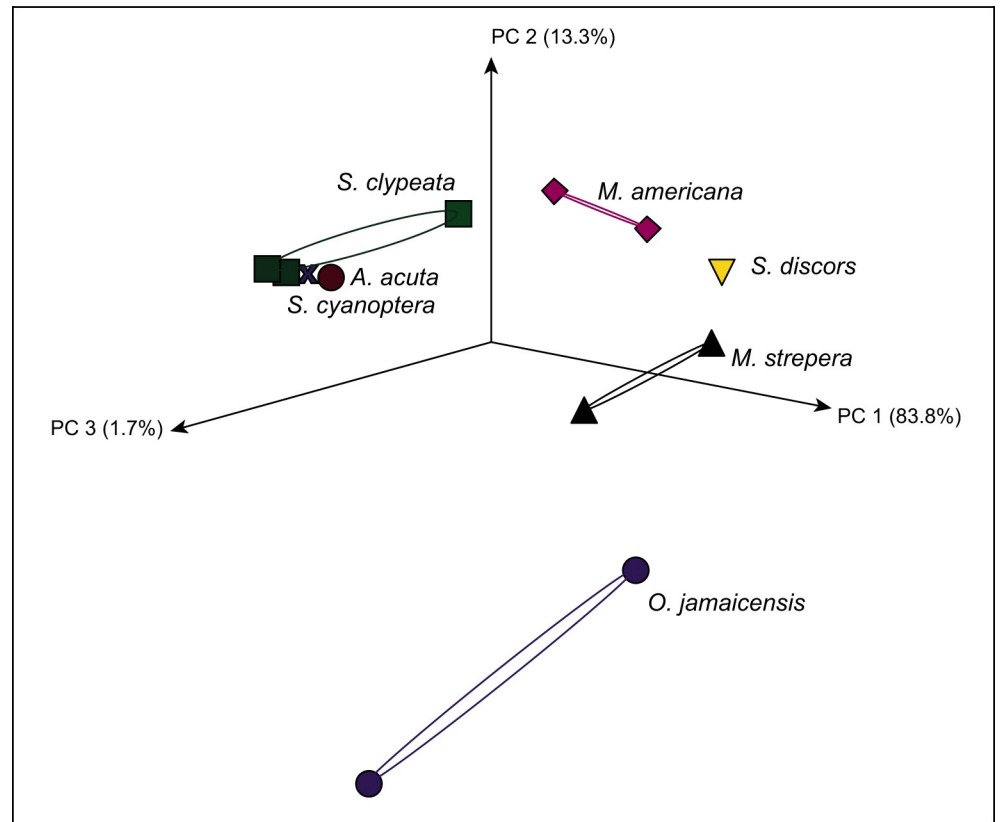
The fecal analysis of wild ducks revealed a complex diversity of vertebrate-, insect-, bacteria- and plant-related viruses. In fact, sequences belonging to *Herpesviridae* family and species such as *Columbid alphaherpesvirus 1* which are associated with disease in pigeons, owls and falcons, were found [27, 28]. Moreover, *Human betaherpesvirus 5* were also identified, this is a ubiquitous herpesvirus that cause generally asymptomatic or self-limiting infections in healthy adult hosts and congenital infection in newborn infants [29]. The *Herpesviridae* family has been previously detected in fresh water samples [30] and in the fecal virome of species such as bats [31, 32], wild rodents [33] and domestic ducks [25, 26]. However, no virus species belonging to this family has been previously reported in virome of ducks, and the abundance of this family in domestic ducks was lower than that obtained in this study. We identified six phage families, namely, *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae*, *Ackermannviridae*, *Inoviridae* and *Microviridae*, as well as sequences related to unclassified bacterial viruses (41%). These families have been previously reported in domestic ducks, but the percentages of phages found in free-living and farm ducks ranged from 1 to 77% [25, 26]. In this study, *Adenoviridae* viruses were detected in all examined species of wild ducks, however, no virus species could be identified by BLASTx. This family has been detected in the intestinal virome, as determined through the



**Fig 3. Heatmap displaying the relative abundances of the viral families.** The relative abundances of the viral families found in wild ducks according to the BLASTn matches are shown. The reads were normalized, analyzed and visualized with MEGAN. The color coding indicates the abundances relative to the mean (red shows high abundance, and blue indicates low abundance).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206970.g003>





**Fig 4. Principal coordinate analysis (PCoA) of the virome compositions of wild ducks.** The analysis was based on a Bray–Curtis dissimilarity matrix that was constructed with MEGAN using normalized reads. The duck species are represented by color figures. The variances explained by the PCs are indicated in parentheses on the axes.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206970.g004>

deep sequencing of samples of domestic ducks [25], broiler chickens [34] and bats [35, 36]. The virus species identified from the *Retroviridae* family are associated with infectious diseases in poultry. The *Avian leukosis virus* and others leukosis/sarcoma viruses induce a wide range of neoplastic conditions is widespread and cause significant economic losses [37, 38]. The *Reticuloendoteliosis virus* infection is common in flocks of chickens, turkeys and ducks, and induce chronic lymphomas and an immunosuppressive runting disease [39]. Additionally, these viruses have been reported in wild ducks [40–42]. We identified viruses related to the *Alloherpesviridae* family, and within this family, virus species of the *Cyprinivirus* genus are associated with hemorrhagic diseases in fish [43, 44]. Fish-related viruses have been previously observed in domestic ducks [26], but the previous study did not mention families or species. Moreover, we identified 22 families that had not been previously detected in fecal samples of migratory wild ducks and 36 viral families that had been previously observed in other studies of fecal or cloacal samples of ducks [25, 26, 45]. Therefore, viruses relevant to veterinary medicine that are possibly disseminated by wild ducks should be monitored, and the possible role of wild ducks harboring human viruses should be further studied. The presence of these vertebrate-related viruses in clinically healthy ducks is not fully understood: it is possible that these duck-associated viruses are persistently infecting ducks. On the other hand, ducks might be carrying viruses present in environments impacted by human activities such as livestock, poultry, fishing, and wastewater. Additionally, the prokaryotic-related viruses might infect bacteria present in the intestine of ducks or in the aquatic ecosystem.

Although the main viral families were detected in all the different analyzed species of ducks, the heatmap analysis showed differences in the abundances of viral families between species and between samples of same species of wild ducks. The identification of similarities in the intestinal communities of the viruses in ducks that share an ecosystem was expected because it has been suggested that the environment influences the virome compositions in individuals who share habitats [46]. The differences in viral abundance could be explained by factors such as age, diet and individual variations. The results revealed that *O. jamaicensis* was the species with the highest abundance of viral families and exhibited high richness indexes. These ducks are diving species and feed on aquatic organisms, seeds and vegetation from the bottom of the water, whereas the others species investigated in this study are dabbling ducks that typically feed on the surface or in the shallows, although they can also graze in fields [47]. The foraging habits of the diving and dabbling ducks could explain the differences in the intestinal virome profiles. Previous studies have not demonstrated that diet influences the composition of the virome in wild birds, but there is evidence suggesting that feeding behavior shapes the structure of the virome in bat species [32]. Moreover, we found variations in the virome profile among species, and this feature has been documented in three different bat species [48]. Therefore, differences in the viral communities of feces from wild ducks can be attributed to their specific ecological niches and to their diets.

Coordinate analysis exhibited similar patterns in virome structure, but also differences between species of wild ducks. Previous studies have indicated the existence of inter-personal variability in the virome composition of humans and domestic ducks [25, 49]. This variability could be explained by multiple factors, such as differences in the ages of the animals or in the levels of immune responses. In chickens, humans and pigs, the intestinal viral community changes according to age [8, 9]. Although variations in viral abundance that are linked to age have not been demonstrated in wild ducks, information regarding the susceptibility of younger mallards to influenza virus A is available, and this infection is the result of an immature immune system [16]. We also need to consider the possible interactions between viruses as a factor that can alter the immune response or the infectiousness of a pathogen that is not related to the intestinal community (i.e., heterologous immunity) [50]. Previous studies have not demonstrated whether infection with some virus could alter the virome structure, but it has been shown that individual infection with a virus can enhance the immune response against a different virus in experimentally infected healthy mice [51]. Moreover, Ganz et al. [52] suggested that infection with a specific virus could alter the bacteriome in wild ducks. Therefore, in the future, we need to continue studying the interactions between viruses and the virome in the intestinal communities of clinically healthy animals and how these interactions allow outbreaks of infectious diseases in domestic animals, and we should also explore the biotic and abiotic factors that influence the variations in relative abundances between different species of duck.

## Conclusions

The relative abundance of duck-related viruses in different species of wild ducks sharing the same habitat is diverse. The role of new viruses that might be found in the intestine of wild ducks is not fully understood, and we hypothesize that these viruses likely inhabit the environment and that their occurrence depends on certain conditions in each ecosystem, such as anthropogenic impact and agricultural and livestock activity. Further study of the viruses harbored by wild migratory ducks is important for monitoring the potential zoonotic risk or outbreaks in domestic animals. Additionally, the factors that determine the compositions of the viromes of different species of wild ducks and their influence in farmed ducks should be elucidated.

## Supporting information

**S1 Table. Virus species identified in feces of wild ducks.** Sequences classified as viruses were compared to a viral protein database using BLASTx. (DOCX)

**S1 Fig. Rarefaction curves for 12 fecal samples.** Rarefaction curves from the BLASTn search were created with MEGAN at the family level. (TIF)

## Acknowledgments

We would like to express our sincere gratitude to Laura Ongay and the Instituto de Fisiología Celular, Unidad de Biología Molecular, UNAM, for providing technical assistance during the sequencing process. We also thank Heliot Zarza Villanueva for helping with the sample collection.

## Author Contributions

**Conceptualization:** Elizabeth Loza-Rubio, Juan Mosqueda, Gary García-Espinosa.

**Data curation:** Luis Alfonso Ramírez-Martínez, Juan Mosqueda.

**Formal analysis:** Luis Alfonso Ramírez-Martínez.

**Funding acquisition:** Gary García-Espinosa.

**Methodology:** Luis Alfonso Ramírez-Martínez, Elizabeth Loza-Rubio, Juan Mosqueda, Manuel Leonardo González-Garay, Gary García-Espinosa.

**Project administration:** Gary García-Espinosa.

**Software:** Luis Alfonso Ramírez-Martínez.

**Supervision:** Elizabeth Loza-Rubio, Juan Mosqueda, Manuel Leonardo González-Garay, Gary García-Espinosa.

**Writing – original draft:** Luis Alfonso Ramírez-Martínez.

**Writing – review & editing:** Elizabeth Loza-Rubio, Juan Mosqueda, Manuel Leonardo González-Garay, Gary García-Espinosa.

## References

1. Hooper LV, Gordon JI. Commensal Host-Bacterial Relationships in the Gut. *Science*. 2001; 292(5519):1115. <https://doi.org/10.1126/science.1058709> PMID: 11352068
2. Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB. Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiol Rev*. 2010; 90(3):859–904. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2009> PMID: 20664075.
3. Virgin Herbert W. The Virome in Mammalian Physiology and Disease. *Cell*. 2014; 157(1):142–50. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.032> PMID: 24679532
4. White DW, Suzanne Beard R, Barton ES. Immune modulation during latent herpesvirus infection. *Immunol Rev*. 2012; 245(1):189–208. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01074.x> PMID: 22168421
5. Virgin HW, Wherry EJ, Ahmed R. Redefining Chronic Viral Infection. *Cell*. 2009; 138(1):30–50. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.036> PMID: 19596234
6. Cadwell K. The Virome in Host Health and Disease. *Immunity*. 2015; 42(5):805–13. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2015.05.003> PMID: 25992857
7. Lim ES, Zhou Y, Zhao G, Bauer IK, Droit L, Ndao IM, et al. Early life dynamics of the human gut virome and bacterial microbiome in infants. *Nat Med*. 2015; 21:1228. <https://doi.org/10.1038/nm.3950> <https://www.nature.com/articles/nm.3950#supplementary-information>. PMID: 26366711

8. Shah JD, Desai PT, Zhang Y, Scharber SK, Baller J, Xing ZS, et al. Development of the Intestinal RNA Virus Community of Healthy Broiler Chickens. *PLoS One*. 2016; 11(2):e0150094. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150094> PMID: 26914580
9. Sachsenröder J, Twardziok SO, Scheuch M, John R. The General Composition of the Faecal Virome of Pigs Depends on Age, but Not on Feeding with a Probiotic Bacterium. *PLoS One*. 2014; 9(2):e88888. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088888> PMID: 24586429
10. Rampelli S, Turrioni S, Schnorr SL, Soverini M, Quercia S, Barone M, et al. Characterization of the human DNA gut virome across populations with different subsistence strategies and geographical origin. *Environ Microbiol*. 2017; 19(11):4728–35. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13938> PMID: 28967228
11. SEMARNAT (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales). Estrategia para la Conservación y Manejo de las Aves Acuáticas y su Hábitat en México. México: Dirección General de Vida Silvestre; 2008.
12. Reeber S. Waterfowl of North America, Europe, and Asia: An Identification Guide. NJ, USA: Princeton University Press; 2016.
13. Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev*. 1992; 56(1):152–79. Epub 1992/03/01. PMID: 1579108; PMCID: PMC372859.
14. Kalthoff D, Globig A, Beer M. (Highly pathogenic) avian influenza as a zoonotic agent. *Vet Microbiol*. 2010; 140(3–4):237–45. Epub 2009/09/29. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.022> PMID: 19782482.
15. Hinshaw VS, Wood JM, Webster RG, Deibel R, Turner B. Circulation of influenza viruses and paramyxoviruses in waterfowl originating from two different areas of North America. *Bull World Health Organ*. 1985; 63(4):711–9. PMID: PMC2536377. PMID: 3878741
16. Stalknecht DE, Shane SM. Host range of avian influenza virus in free-living birds. *Vet Res Commun*. 1988; 12(2):125–41. <https://doi.org/10.1007/bf00362792>
17. RAMSAR. The Ramsar Convention Secretariat Gland, Switzerland. 2014 [April, 2018]. Available from: <http://www.ramsar.org/wetland/mexico>.
18. SEMARNAT (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales). Estrategia para la conservación, manejo y aprovechamiento de las aves acuáticas y su hábitat en México. Ciudad de México, México: Dirección General de Vida Silvestre; 2008.
19. Hernández-Colina A, Yadeun M, García-Espinosa G. Comunidad de aves acuáticas de un humedal protegido en el Estado de México, México. *Huitzil, Revista Mexicana de Ornitología* [Internet]. 2018 abril, 2018; 19(1):[85–95 pp.]. Available from: <http://ojs.huitzil.net/index.php/huitzil/article/view/310>.
20. Day JM, Ballard LL, Duke MV, Scheffler BE, Zsak L. Metagenomic analysis of the turkey gut RNA virus community. *Virology*. 2010; 7:313. Epub 2010/11/16. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-313> PMID: 21073719; PMCID: PMC2991317.
21. Victoria JG, Kapoor A, Dupuis K, Schnurr DP, Delwart EL. Rapid Identification of Known and New RNA Viruses from Animal Tissues. *PLoS Pathog*. 2008; 4(9):e1000163. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000163> PMID: PMC2533695. PMID: 18818738
22. Ullmann LS, de Camargo Tozato C, Malossi CD, da Cruz TF, Cavalcante RV, Kurissio JK, et al. Comparative clinical sample preparation of DNA and RNA viral nucleic acids for a commercial deep sequencing system (Illumina MiSeq((R))). *J Virol Methods*. 2015; 220:60–3. Epub 2015/04/23. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.04.009> PMID: 25901649.
23. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*. 2009; 25(14):1754–60. Epub 2009/05/20. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324> PMID: 19451168; PMCID: PMC2705234.
24. Huson DH, Beier S, Flade I, Gorska A, El-Hadidi M, Mitra S, et al. MEGAN Community Edition—Interactive Exploration and Analysis of Large-Scale Microbiome Sequencing Data. *PLoS Comput Biol*. 2016; 12(6):e1004957. Epub 2016/06/22. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004957> PMID: 27327495; PMCID: PMC4915700.
25. Zhao L, Niu Y, Lu T, Yin H, Zhang Y, Xu L, et al. Metagenomic Analysis of the Jinding Duck Fecal Virome. *Curr Microbiol*. 2018. <https://doi.org/10.1007/s00284-018-1430-3> PMID: 29368024
26. Fawaz M, Vijayakumar P, Mishra A, Gandhale PN, Dutta R, Kamble NM, et al. Duck gut viral metagenome analysis captures snapshot of viral diversity. *Gut Pathog*. 2016; 8(1):30. <https://doi.org/10.1186/s13099-016-0113-5> PMID: 27284287
27. Callinan RB, Kefford B, Borland R, Garrett R. An outbreak of disease in pigeons associated with a herpesvirus. *Aust Vet J*. 1979; 55(7):339–41. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1979.tb00421.x> PMID: 229817

28. Gailbreath KL, Oaks JL. Herpesviral inclusion body disease in owls and falcons is caused by the pigeon herpesvirus (columbid herpesvirus 1). *J Wildl Dis.* 2008; 44(2):427–33. Epub 2008/04/26. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-44.2.427> PMID: 18436674.
29. Britt WJ, Prichard MN. New therapies for human cytomegalovirus infections. *Antiviral Res.* 2018. Epub 2018/09/19. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.09.003> PMID: 30227153.
30. Mohiuddin M, Schellhorn HE. Spatial and temporal dynamics of virus occurrence in two freshwater lakes captured through metagenomic analysis. *Front Microbiol.* 2015; 6:960. Epub 2015/10/07. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00960> PMID: 26441894; PMCID: PMC4569853.
31. Geldenhuys M, Mortlock M, Weyer J, Bezuidt O, Seamark ECJ, Kearney T, et al. A metagenomic viral discovery approach identifies potential zoonotic and novel mammalian viruses in *Neoromicia* bats within South Africa. *PLoS One.* 2018; 13(3):e0194527. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194527> PMID: 29579103
32. Salmier A, Tirera S, de Thoisy B, Franc A, Darcissac E, Donato D, et al. Virome analysis of two sympatric bat species (*Desmodus rotundus* and *Molossus molossus*) in French Guiana. *PLoS One.* 2017; 12(11):e0186943. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186943> PMID: 29117243
33. Phan TG, Kapusinszky B, Wang C, Rose RK, Lipton HL, Delwart EL. The fecal viral flora of wild rodents. *PLoS Pathog.* 2011; 7(9):e1002218. Epub 2011/09/13. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002218> PMID: 21909269; PMCID: PMC3164639.
34. Lima DA, Cibulski SP, Finkler F, Teixeira TF, Varela APM, Cerva C, et al. Faecal virome of healthy chickens reveals a large diversity of the eukaryote viral community, including novel circular ssDNA viruses. *J Gen Virol.* 2017; 98(4):690–703. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000711> PMID: 28100302
35. Hu D, Zhu C, Wang Y, Ai L, Yang L, Ye F, et al. Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bats from Southeast China. *Sci Rep.* 2017; 7(1):10917. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11384-w> PMID: 28883450
36. Li L, Victoria JG, Wang C, Jones M, Fellers GM, Kunz TH, et al. Bat guano virome: predominance of dietary viruses from insects and plants plus novel mammalian viruses. *J Virol.* 2010; 84(14):6955–65. Epub 2010/05/14. <https://doi.org/10.1128/JVI.00501-10> PMID: 20463061; PMCID: PMC2898246.
37. Fadly AM. Isolation and identification of avian leukosis viruses: A review. *Avian Pathol.* 2000; 29(6):529–35. <https://doi.org/10.1080/03079450020016760> PMID: 19184848
38. Nair V, Fadly AM. Neoplastic Diseases. Leukosis/Sarcoma Group. In: Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, Nair VL, editors. *Diseases of Poultry.* 13th ed: John Wiley & Sons, Inc.; 2013. p. 553–92.
39. Nair V, Zavala G, Fadly AM. Neoplastic Diseases. Reticuloendotheliosis. In: Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, Nair VL, editors. *Diseases of Poultry.* John Wiley & Sons, Inc.; 2013. p. 593–604.
40. Li D, Qin L, Gao H, Yang B, Liu W, Qi X, et al. Avian leukosis virus subgroup A and B infection in wild birds of Northeast China. *Vet Microbiol.* 2013; 163(3):257–63. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.01.020>.
41. Zeng X, Liu L, Hao R, Han C. Detection and Molecular Characterization of J Subgroup Avian Leukosis Virus in Wild Ducks in China. *PLoS One.* 2014; 9(4):e94980. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094980> PMID: 24733260
42. Jiang L, Deng X, Gao Y, Li K, Chai H, Fan Z, et al. First isolation of reticuloendotheliosis virus from mallards in China. *Arch Virol.* 2014; 159(8):2051–7. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1821-5> PMID: 24643331
43. Gotesman M, Kattlun J, Bergmann SM, El-Matbouli M. CyHV-3: the third cyprinid herpesvirus. *Dis Aquat Organ.* 2013; 105(2):163–74. Epub 2013/07/23. <https://doi.org/10.3354/dao02614> PMID: 23872859; PMCID: PMC3961040.
44. Siti-Zahrah A, Zamri-Saad M, Firdaus-Nawi M, Hazreen-Nita MK, Nur-Nazifah M. Detection of channel catfish virus in cage-cultured *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage, 1878) in Malaysia. *J Fish Dis.* 2014; 37(11):981–3. Epub 2013/10/15. <https://doi.org/10.1111/jfd.12185> PMID: 24117659.
45. Qiu Y, Chen J-M, Wang T, Hou G-Y, Zhuang Q-Y, Wu R, et al. Detection of viromes of RNA viruses using the next generation sequencing libraries prepared by three methods. *Virus Res.* 2017; 237:22–6. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.05.003> PMID: 28501627
46. Robles-Sikisaka R, Ly M, Boehm T, Naidu M, Salzman J, Pride DT. Association between living environment and human oral viral ecology. *The Isme Journal.* 2013; 7:1710. <https://doi.org/10.1038/ismej.2013.63> <https://www.nature.com/articles/ismej201363#supplementary-information>. PMID: 23598790
47. Drilling N, Titman R. D. McKinney F. Mallard (*Anas platyrhynchos*). 2002 [cited June, 2018]. In: *The Birds of North America* [Internet]. Ithaca, NY, USA: Cornell Lab of Ornithology, [cited June, 2018]. Available from: <https://birdsna.org/Species-Account/bna/species/mallar/introduction>.

48. Donaldson EF, Haskew AN, Gates JE, Huynh J, Moore CJ, Frieman MB. Metagenomic analysis of the viromes of three North American bat species: viral diversity among different bat species that share a common habitat. *J Virol.* 2010; 84(24):13004–18. <https://doi.org/10.1128/JVI.01255-10> PMID: [20926577](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20926577/); PMCID: PMC3004358.
49. Minot S, Sinha R, Chen J, Li H, Keilbaugh SA, Wu GD, et al. The human gut virome: inter-individual variation and dynamic response to diet. *Genome Res.* 2011; 21(10):1616–25. <https://doi.org/10.1101/gr.122705.111> PMID: [21880779](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21880779/); PMCID: PMC3202279.
50. Welsh R, Che J, Brehm M, Selin L. Heterologous immunity between viruses. *Immunol Rev.* 2010; 235(1):244–66. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2010.00897.x> PMID: [20536568](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20536568/)
51. Furman D, Jovic V, Sharma S, Shen-Orr SS, Angel CJ, Onengut-Gumuscu S, et al. Cytomegalovirus infection enhances the immune response to influenza. *Sci Transl Med.* 2015; 7(281):281ra43. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaa2293> PMID: [25834109](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25834109/); PMCID: PMC34505610.
52. Ganz HH, Doroud L, Firl AJ, Hird SM, Eisen JA, Boyce WM. Community-Level Differences in the Microbiome of Healthy Wild Mallards and Those Infected by Influenza A Viruses. *mSystems.* 2017; 2(1):e00188–16. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00188-16>. PMID: [28293681](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28293681/)

## XI. REFERENCIAS

Aber JS, Pavri, F. and Aber, S. W. 2012a. Environmental Cycles and Feedback. *In: Aber JS, Pavri F and Aber SW (eds) Wetland environments: A Global Perspective*. John Wiley & Sons, Ltd.

Aber JS, Pavri, F. and Aber, S. W. 2012b. Wetland Wildlife. *In: Aber JS, Pavri F and Aber SW (eds) Wetland environments: A Global Perspective*. John Wiley & Sons, Ltd.

Aldous EW, Mynn JK, Banks J and Alexander DJ. 2003. A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. *Avian Pathology*, 32: 239-257. doi:10.1080/030794503100009783

Alexander DJ. 1993. Paramyxovirus Infection. *In: McFerran JB and McNulty MS (eds) Virus Infections of Birds*. Elsevier Science Publishers, 321-340.

Alexander DJ. 2000. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Revue Scientifique et Technique*, 19: 443-462.

Alexander DJ and Senne DA. 2008. Newcastle disease, other avian paramyxoviruses, and pneumovirus infections. *In: Saif Y, Fadly A, Glisson J, et al. (eds) Diseases of poultry*. Ames: Iowa State University Press.

Amimo JO, El Zowalaty ME, Githae D, Wamalwa M, Djikeng A and Nasrallah GK. 2016. Metagenomic analysis demonstrates the diversity of the fecal virome in asymptomatic pigs in East Africa. *Archives of Virology*, 161: 887-897. doi:10.1007/s00705-016-2819-6

Barbier EB. 1993. Sustainable Use of Wetlands Valuing Tropical Wetland Benefits: Economic Methodologies and Applications. *The Geographical Journal*, 159: 22-32. doi:10.2307/3451486

Barrón RRJ. 2009. *Aislamiento e identificación de mixovirus aviares en un humedal del Estado de México a partir de agua y patos centinelas*. (Maestría), Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Ciudad de México, México.

Bobbink R, Whigham DF, Beltman B and Verhoeven JTA. 2006. Wetland Functioning in Relation to Biodiversity Conservation and Restoration. *In: Bobbink R, Beltman B, Verhoeven JTA, et al. (eds) Wetlands: Functioning, Biodiversity Conservation, and Restoration*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1-12.

Bodewes R, Ruiz-Gonzalez A, Schapendonk CM, van den Brand JM, Osterhaus AD and Smits SL. 2014. Viral metagenomic analysis of feces of wild small carnivores. *Virology Journal*, 11: 89. doi:10.1186/1743-422x-11-89

Bragg L and Tyson GW. 2014. Metagenomics using next-generation sequencing. *In Paulsen I and Holmes AJ (eds), Environmental Microbiology Methods and Protocols*. Humana Press.

Brash ML, Swinton JN, Weisz A and Ojkic D. 2009. Isolation and identification of duck adenovirus 1 in ducklings with proliferative tracheitis in Ontario. *Avian Diseases*, 53: 317-320. doi:10.1637/8559-121508-Case.1

- Breitbart M, Hewson I, Felts B, Mahaffy JM, Nulton J, Salamon P and Rohwer F. 2003. Metagenomic analyses of an uncultured viral community from human feces. *Journal of Bacteriology*, 185: 6220-6223.
- Bridgham SD, Megonigal JP, Keller JK, Bliss NB and Trettin C. 2006. The carbon balance of North American wetlands. *Wetlands*, 26: 889-916.
- Britt WJ and Prichard MN. 2018. New therapies for human cytomegalovirus infections. *Antiviral Research*. doi:10.1016/j.antiviral.2018.09.003
- Brochet A-L, Guillemain M, Fritz H, Gauthier-Clerc M and Green AJ. 2009. The role of migratory ducks in the long-distance dispersal of native plants and the spread of exotic plants in Europe. *Ecography*, 32: 919-928. doi:doi:10.1111/j.1600-0587.2009.05757.x
- Brown JD, Goekjian G, Poulson R, Valeika S and Stallknecht DE. 2009. Avian influenza virus in water: Infectivity is dependent on pH, salinity and temperature. *Veterinary Microbiology*, 136: 20-26. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.10.027
- Callinan RB, Kefford B, Borland R and Garrett R. 1979. An outbreak of disease in pigeons associated with a herpesvirus. *Australian Veterinary Journal*, 55: 339-341. doi:doi:10.1111/j.1751-0813.1979.tb00421.x
- Carrera González E, De La Fuente De León G, Moreno Talamantes A and Adrián Leal-Nares O. 2010. *Inventario y clasificación de humedales en México*. Paper presented at the XIV International SELPER's Symposium, Guanajuato, Gto., México.
- Coffee LL, Hanson BA, Luttrell MP, Swayne DE, Senne DA, Goekjian VH, Niles LJ and Stallknecht DE. 2010. Avian paramyxoviruses in shorebirds and gulls. *Journal of Wildlife Diseases*, 46: 481-487. doi:10.7589/0090-3558-46.2.481
- Corrand L, Gelfi J, Albaric O, Etievant M, Pingret JL and Guerin JL. 2011. Pathological and epidemiological significance of goose haemorrhagic polyomavirus infection in ducks. *Avian Pathology*, 40: 355-360. doi:10.1080/03079457.2011.582481
- Cotten M, Petrova V, Phan MV, Rabaa MA, Watson SJ, Ong SH, Kellam P and Baker S. 2014. Deep sequencing of norovirus genomes defines evolutionary patterns in an urban tropical setting. *Journal of Virology*, 88: 11056-11069. doi:10.1128/JVI.01333-14
- Cowardin LM, Carter V, Golet FC and LaRoe ET. 1979. *Classification of Wetlands and Deepwater Habitats of the United States*. Available: <https://www.fws.gov/wetlands/Documents/Classification-of-Wetlands-and-Deepwater-Habitats-of-the-United-States.pdf> [Accessed July, 2018].
- Cuevas-Domínguez EA, González-Guzmán S, Quintana-López JA, Loza-Rubio E, González-Rebeles C and García-Espinosa G. 2009. *Detección de orthomyxovirus H7N3 en anátidos del Estado de México*. *Revista Electrónica de Veterinaria* [Online], 10. Available: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n040409/040909.pdf> [Accessed may, 2018].
- Cha SY, Kang M, Park CK, Choi KS and Jang HK. 2013. Epidemiology of egg drop syndrome virus in ducks from South Korea. *Poultry Science*, 92: 1783-1789. doi:10.3382/ps.2013-03067



- Charalambidou I and Santamaría L. 2005. Field evidence for the potential of waterbirds as dispersers of aquatic organisms. *Wetlands*, 25: 252-258. doi:10.1672/2
- Chmura GL, Anisfeld SC, Cahoon DR and Lynch JC. 2003. Global carbon sequestration in tidal, saline wetland soils. *Global Biogeochemical Cycles*, 17. doi:doi:10.1029/2002GB001917
- Chu DK, Leung CY, Gilbert M, Joyner PH, Ng EM, Tse TM, Guan Y, Peiris JS and Poon LL. 2011. Avian coronavirus in wild aquatic birds. *Journal of Virology*, 85: 12815-12820. doi:10.1128/jvi.05838-11
- Chu DK, Leung CY, Perera HK, Ng EM, Gilbert M, Joyner PH, Grioni A, Ades G, Guan Y, Peiris JS and Poon LL. 2012. A novel group of avian astroviruses in wild aquatic birds. *Journal of Virology*, 86: 13772-13778. doi:10.1128/jvi.02105-12
- Dahl T and Stedman S. 2013. *Status and trends of wetlands in the coastal watersheds of the Conterminous United States 2004 to 2009*. Available: <https://www.fws.gov/wetlands/Documents/Status-and-Trends-of-Wetlands-in-the-Conterminous-United-States-2004-to-2009.pdf> [Accessed July, 2018].
- Day JM, Ballard LL, Duke MV, Scheffler BE and Zsak L. 2010. Metagenomic analysis of the turkey gut RNA virus community. *Virology Journal*, 7: 313. doi:10.1186/1743-422x-7-313
- Day JM and Zsak L. 2013. Molecular and Phylogenetic Analysis of a Novel Turkey-Origin Picobirnavirus. *Avian Diseases*, 58: 137-142. doi:10.1637/10593-061313-ResNote.1
- Deliberto TJ, Swafford SR, Nolte DL, Pedersen K, Lutman MW, Schmit BB, Baroch JA, Kohler DJ and Franklin A. 2009. Surveillance for highly pathogenic avian influenza in wild birds in the USA. *Integr Zool*, 4: 426-439. doi:10.1111/j.1749-4877.2009.00180.x
- Domanska-Blicharz K, Jacukowicz A, Lisowska A, Wyrostek K and Minta Z. 2014. Detection and molecular characterization of infectious bronchitis-like viruses in wild bird populations. *Avian Pathology*, 43: 406-413. doi:10.1080/03079457.2014.949619
- Donaldson EF, Haskew AN, Gates JE, Huynh J, Moore CJ and Frieman MB. 2010. Metagenomic analysis of the viromes of three North American bat species: viral diversity among different bat species that share a common habitat. *Journal of Virology*, 84: 13004-13018. doi:10.1128/JVI.01255-10
- Drilling N, Titman R. D. and McKinney F. . 2002. Mallard (*Anas platyrhynchos*). In Poole AF and Gill FB (eds), *The Birds of North America*. Ithaca, NY, USA: Cornell Lab of Ornithology. Retrieved from <https://birdsna.org/Species-Account/bna/species/mallar/introduction>. doi:<https://doi.org/10.2173/bna.658>
- Dugan VG, Chen R, Spiro DJ, Sengamalay N, Zaborsky J, Ghedin E, Nolting J, Swayne DE, Runstadler JA, Happ GM, Senne DA, Wang R, Slemons RD, Holmes EC and Taubenberger JK. 2008. The evolutionary genetics and emergence of avian influenza viruses in wild birds. *PLoS Pathogens*, 4: e1000076. doi:10.1371/journal.ppat.1000076

Durães-Carvalho R, Caserta LC, Barnabé ACS, Martini MC, Simas PVM, Santos MMB, Salemi M and Arns CW. 2015. Phylogenetic and phylogeographic mapping of the avian coronavirus spike protein-encoding gene in wild and synanthropic birds. *Virus Research*, 201: 101-112. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2015.03.002>

Edwards RA and Rohwer F. 2005. Viral metagenomics. *Nature Reviews: Microbiology*, 3: 504-510. doi:10.1038/nrmicro1163

Fadly AM. 2000. Isolation and identification of avian leukosis viruses: A review. *Avian Pathology*, 29: 529-535. doi:10.1080/03079450020016760

Fawaz M, Vijayakumar P, Mishra A, Gandhale PN, Dutta R, Kamble NM, Sudhakar SB, Roychoudhary P, Kumar H, Kulkarni DD and Raut AA. 2016. Duck gut viral metagenome analysis captures snapshot of viral diversity. *Gut Pathogens*, 8: 30. doi:10.1186/s13099-016-0113-5

Figuerola J and Green AJ. 2002. Dispersal of aquatic organisms by waterbirds: a review of past research and priorities for future studies. *Freshwater Biology*, 47: 483-494. doi:10.1046/j.1365-2427.2002.00829.x

Finlayson C and Davidson N. 1999. Summary Report. In Finlayson C and Spiers A (eds), *Global review of wetland resources and priorities for wetland inventory*. Canberra, Australia: Supervising Scientist/ Wetland International Publication. Retrieved from <http://www.environment.gov.au/system/files/resources/b7be7f68-4522-4aa5-8e86-de5cabd21645/files/ssr144-full-report-web.pdf>.

Finlayson CM, Milton GR and Prentice RC. 2018. Wetland Types and Distribution. In: Finlayson CM, Milton GR, Prentice RC, et al. (eds) *The Wetland Book: II: Distribution, Description, and Conservation*. Dordrecht: Springer Netherlands, 19-35.

Firth C, Bhat M, Firth MA, Williams SH, Frye MJ, Simmonds P, Conte JM, Ng J, Garcia J, Bhuvan NP, Lee B, Che X, Quan PL and Lipkin WI. 2014. Detection of zoonotic pathogens and characterization of novel viruses carried by commensal *Rattus norvegicus* in New York City. *MBio*, 5: e01933-01914. doi:10.1128/mBio.01933-14

Fouchier RA and Munster VJ. 2009. Epidemiology of low pathogenic avian influenza viruses in wild birds. *Revue Scientifique et Technique*, 28: 49-58.

Furman D, Jojic V, Sharma S, Shen-Orr SS, Angel CJ, Onengut-Gumuscu S, Kidd BA, Maecker HT, Concannon P, Dekker CL, Thomas PG and Davis MM. 2015. Cytomegalovirus infection enhances the immune response to influenza. *Science Translational Medicine*, 7: 281ra243. doi:10.1126/scitranslmed.aaa2293

Gailbreath KL and Oaks JL. 2008. Herpesviral inclusion body disease in owls and falcons is caused by the pigeon herpesvirus (columbid herpesvirus 1). *Journal of Wildlife Diseases*, 44: 427-433. doi:10.7589/0090-3558-44.2.427

Ganz HH, Doroud L, Firl AJ, Hird SM, Eisen JA and Boyce WM. 2017. Community-Level Differences in the Microbiome of Healthy Wild Mallards and Those Infected by Influenza A Viruses. *mSystems*, 2: e00188-00116. doi:<https://doi.org/10.1128/mSystems.00188-16>

- Ge X, Li Y, Yang X, Zhang H, Zhou P, Zhang Y and Shi Z. 2012. Metagenomic analysis of viruses from bat fecal samples reveals many novel viruses in insectivorous bats in China. *Journal of Virology*, 86: 4620-4630. doi:10.1128/jvi.06671-11
- Geldenhuys M, Mortlock M, Weyer J, Bezuidt O, Seamark ECJ, Kearney T, Gleasner C, Erkkila TH, Cui H and Markotter W. 2018. A metagenomic viral discovery approach identifies potential zoonotic and novel mammalian viruses in Neoromicia bats within South Africa. *PloS One*, 13: e0194527. doi:10.1371/journal.pone.0194527
- Globig A, Baumer A, Revilla-Fernandez S, Beer M, Wodak E, Fink M, Greber N, Harder TC, Wilking H, Brunhart I, Matthes D, Kraatz U, Strunk P, Fiedler W, Fereidouni SR, Staubach C, Conraths FJ, Griot C, Mettenleiter TC and Stark KD. 2009. Ducks as sentinels for avian influenza in wild birds. *Emerging Infectious Diseases*, 15: 1633-1636. doi:10.3201/eid1510.090439
- Gotesman M, Kattlun J, Bergmann SM and El-Matbouli M. 2013. CyHV-3: the third cyprinid herpesvirus. *Diseases of Aquatic Organisms*, 105: 163-174. doi:10.3354/dao02614
- Gray MJ, Chamberlain MJ, Buehler DA and Sutton WB. 2013a. Wetland Wildlife Monitoring and Assessment. In: Anderson JT and Davis CA (eds) *Wetland Techniques: Volume 2: Organisms*. Dordrecht: Springer Netherlands, 265-318.
- Gray MJ, Hagy HM, Nyman JA and Stafford JD. 2013b. Management of Wetlands for Wildlife. In: Anderson JT and Davis CA (eds) *Wetland Techniques: Volume 3: Applications and Management*. Dordrecht: Springer Netherlands, 121-180.
- Green AJ and Elmberg J. 2014. Ecosystem services provided by waterbirds. *Biological Reviews*, 89: 105-122. doi:10.1111/brv.12045
- Green AJ and Figuerola J. 2005. Recent advances in the study of long-distance dispersal of aquatic invertebrates via birds. *Diversity and Distributions*, 11: 149-156. doi:doi:10.1111/j.1366-9516.2005.00147.x
- Green AJ, Hamzaoui ME, El Agbani MA and Franchimont J. 2002. The conservation status of Moroccan wetlands with particular reference to waterbirds and to changes since 1978. *Biological Conservation*, 104: 71-82. doi:https://doi.org/10.1016/S0006-3207(01)00155-0
- Groombridge B. 1992. Wetlands. In: Groombridge B (ed) *Global Biodiversity: Status of the Earth's Living Resources*. Dordrecht: Springer Netherlands, 293-306.
- Hernández-Colina A, Yadeun M and García-Espinosa G. 2018. Comunidad de aves acuáticas de un humedal protegido en el Estado de México, México. *Huitzil, Revista Mexicana de Ornitología* [Online], 19. Available: <http://ojs.huitzil.net/index.php/huitzil/article/view/310> [Accessed april, 2018].
- Hines NL and Miller CL. 2012. Avian paramyxovirus serotype-1: a review of disease distribution, clinical symptoms, and laboratory diagnostics. *Veterinary Medicine International*, 2012: 708216. doi:10.1155/2012/708216

Hinshaw VS, Bean WJ, Webster RG and Sriram G. 1980. Genetic reassortment of influenza A viruses in the intestinal tract of ducks. *Virology*, 102: 412-419.

Hinshaw VS, Webster RG and Turner B. 1979. Water-Borne Transmission of Influenza A Viruses? *Intervirology*, 11: 66-68.

Hlinak A, Muhle RU, Werner O, Globig A, Starick E, Schirrmeier H, Hoffmann B, Engelhardt A, Hubner D, Conraths FJ, Wallschläger D, Kruckenberg H and Müller T. 2006. A virological survey in migrating waders and other waterfowl in one of the most important resting sites of Germany. *Journal of Veterinary Medicine. B: Infectious Diseases and Veterinary Public Health*, 53: 105-110. doi:10.1111/j.1439-0450.2006.00935.x

Horimoto T, Rivera E, Pearson J, Senne D, Krauss S, Kawaoka Y and Webster RG. 1995. Origin and Molecular Changes Associated with Emergence of a Highly Pathogenic H5N2 Influenza Virus in Mexico. *Virology*, 213: 223-230. doi:http://dx.doi.org/10.1006/viro.1995.1562

Hu D, Zhu C, Wang Y, Ai L, Yang L, Ye F, Ding C, Chen J, He B, Zhu J, Qian H, Xu W, Feng Y, Tan W and Wang C. 2017. Virome analysis for identification of novel mammalian viruses in bats from Southeast China. *Scientific Reports*, 7: 10917. doi:10.1038/s41598-017-11384-w

Huovilainen A, Ek-Kommone C, Manvell R and Kinnunen L. 2001. Phylogenetic analysis of avian paramyxovirus 1 strains isolated in Finland. *Archives of Virology*, 146: 1775-1785.

Huson DH, Beier S, Flade I, Gorska A, El-Hadidi M, Mitra S, Ruscheweyh HJ and Tappu R. 2016. MEGAN Community Edition - Interactive Exploration and Analysis of Large-Scale Microbiome Sequencing Data. *PLoS Computational Biology*, 12: e1004957. doi:10.1371/journal.pcbi.1004957

Jasmin J-N, Rochefort L and Gauthier G. 2008. Goose grazing influences the fine-scale structure of a bryophyte community in arctic wetlands. *Polar Biology*, 31: 1043-1049. doi:10.1007/s00300-008-0443-y

Jeon W-J, Lee E-K, Joh S-J, Kwon J-h, Yang C-B, Yoon Y-S and Choi K-S. 2008. Very virulent infectious bursal disease virus isolated from wild birds in Korea: Epidemiological implications. *Virus Research*, 137: 153-156. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2008.06.013

Jiang L, Deng X, Gao Y, Li K, Chai H, Fan Z, Ren X, Wang Q, Zhang L, Yun B, Yin C, Chen Y, Qin L, Gao H, Wang Y, Hua Y and Wang X. 2014. First isolation of reticuloendotheliosis virus from mallards in China. *Archives of Virology*, 159: 2051-2057. doi:10.1007/s00705-013-1821-5

Jiang T, Lu X, Yuan Y, Zheng L, Shi J and Zhang D. 2012. Complete genomic sequence of a Muscovy duck-origin reticuloendotheliosis virus from China. *Journal of Virology*, 86: 13140-13141. doi:10.1128/JVI.02531-12

Jorgensen PH, Handberg KJ, Ahrens P, Therkildsen OR, Manvell RJ and Alexander DJ. 2004. Strains of avian paramyxovirus type 1 of low pathogenicity for chickens isolated from poultry and wild birds in Denmark. *Veterinary Record*, 154: 497-500.

Keel MK, Stallknecht D, Cobb D, Cunningham M, Goekjian V, Gordon-Akhvlediani S and Fischer JR. 2013. The epizootiology of anatid herpesvirus 1 infection in free-flying waterfowl: a comparison of latent and active infections among native waterfowl, captive-reared released ducks,

and peridomestic or feral ducks. *Journal of Wildlife Diseases*, 49: 486-491. doi:10.7589/2012-10-250

Keeler SP, Berghaus RD and Stallknecht DE. 2012. Persistence of low pathogenic avian influenza viruses in filtered surface water from waterfowl habitats in Georgia, USA. *Journal of Wildlife Diseases*, 48: 999-1009. doi:10.7589/2011-11-314

Kim LM, King DJ, Curry PE, Suarez DL, Swayne DE, Stallknecht DE, Slemons RD, Pedersen JC, Senne DA, Winker K and Afonso CL. 2007. Phylogenetic diversity among low-virulence newcastle disease viruses from waterfowl and shorebirds and comparison of genotype distributions to those of poultry-origin isolates. *Journal of Virology*, 81: 12641-12653. doi:10.1128/jvi.00843-07

Kim MS, Whon TW and Bae JW. 2013. Comparative viral metagenomics of environmental samples from Korea. *Genomics Inform*, 11: 121-128. doi:10.5808/gi.2013.11.3.121

Kim T and Mundt E. 2011. Metagenomic analysis of intestinal microbiomes in chickens. *Methods in Molecular Biology*, 733: 185-194. doi:10.1007/978-1-61779-089-8\_13

King AMQ, Adams MJ, Lefkowitz EJ and Carstens EB. 2011a. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*: Elsevier Academic Press.

King AMQ, Lefkowitz E, Adams MJ and Carstens EB. 2011b. Part II: The negative sense single stranded RNA viruses. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*  
Elsevier Science.

Krauss S, Obert CA, Franks J, Walker D, Jones K, Seiler P, Niles L, Pryor SP, Obenauer JC, Naeve CW, Widjaja L, Webby RJ and Webster RG. 2007. Influenza in migratory birds and evidence of limited intercontinental virus exchange. *PLoS Pathogens*, 3: e167. doi:10.1371/journal.ppat.0030167

Kuhn JH, Verdugo C, Fan Ng TF, Kumar MS, Kang-Seuk C, Matsumiya TL and Neira RVM. 2017. *Six (6) new species in the genus Avulavirus (Mononegavirales: Paramyxoviridae)*. Available: [https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode\\_id=20185579](https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=20185579) [Accessed July, 2018].

Kumar S, Nayak B, Samuel AS, Xiao S, Collins PL and Samal SK. 2010. Complete genome sequence of avian paramyxovirus-3 strain Wisconsin: Evidence for the existence of subgroups within the serotype. *Virus Research*, 149: 78-85. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2009.12.015>

Lamb R and Parks G. 2007. Paramyxoviridae: the viruses and their replication. In: Knipe DM HP, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B, Straus SE (ed) *Fields' Virology*. 5th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.

Lang AS, Kelly A and Runstadler JA. 2008. Prevalence and diversity of avian influenza viruses in environmental reservoirs. *Journal of General Virology*, 89: 509-519. doi:10.1099/vir.0.83369-0

Lehner B and Döll P. 2004. Development and validation of a global database of lakes, reservoirs and wetlands. *Journal of Hydrology*, 296: 1-22. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2004.03.028>

- LePage BA. 2011. Wetlands: A Multidisciplinary Perspective. *In: LePage BA (ed) Wetlands: Integrating Multidisciplinary Concepts*. Dordrecht: Springer Netherlands, 3-25.
- Li D, Qin L, Gao H, Yang B, Liu W, Qi X, Wang Y, Zeng X, Liu S, Wang X and Gao Y. 2013. Avian leukosis virus subgroup A and B infection in wild birds of Northeast China. *Veterinary Microbiology*, 163: 257-263. doi:<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.01.020>
- Li H and Durbin R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, 25: 1754-1760. doi:[10.1093/bioinformatics/btp324](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324)
- Li L, Victoria JG, Wang C, Jones M, Fellers GM, Kunz TH and Delwart E. 2010. Bat guano virome: predominance of dietary viruses from insects and plants plus novel mammalian viruses. *Journal of Virology*, 84: 6955-6965. doi:[10.1128/jvi.00501-10](https://doi.org/10.1128/jvi.00501-10)
- Liao Q, Zheng L, Yuan Y, Shi J and Zhang D. 2014. Genomic characterization of a novel picornavirus in Pekin ducks. *Veterinary Microbiology*, 172: 78-91. doi:[10.1016/j.vetmic.2014.05.002](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.05.002)
- Lima DA, Cibulski SP, Finkler F, Teixeira TF, Varela APM, Cerva C, Loiko MR, Scheffer CM, dos Santos HF, Mayer FQ and Roehe PM. 2017. Faecal virome of healthy chickens reveals a large diversity of the eukaryote viral community, including novel circular ssDNA viruses. *Journal of General Virology*, 98: 690-703. doi:[doi:10.1099/jgv.0.000711](https://doi.org/10.1099/jgv.0.000711)
- Lu L, Lycett SJ and Leigh Brown AJ. 2014. Reassortment patterns of avian influenza virus internal segments among different subtypes. *BMC Evolutionary Biology*, 14: 16. doi:[10.1186/1471-2148-14-16](https://doi.org/10.1186/1471-2148-14-16)
- Maurel S, Toquin D, Briand FX, Quéguiner M, Allée C, Bertin J, Ravillion L, Retaux C, Turblin V, Morvan H and Etteradossi N. 2011. First full-length sequences of the S gene of European isolates reveal further diversity among turkey coronaviruses. *Avian Pathology*, 40: 179-189. doi:[10.1080/03079457.2011.551936](https://doi.org/10.1080/03079457.2011.551936)
- McFerran JB and McNulty MS. 1993. *Virus Infections of Birds*: Elsevier Science Publishers.
- Medina RA and Garcia-Sastre A. 2011. Influenza A viruses: new research developments. *Nature Reviews: Microbiology*, 9: 590-603. doi:[10.1038/nrmicro2613](https://doi.org/10.1038/nrmicro2613)
- Miles AK, Lawler SP, Dritz D and Spring S. 2002. Effects of mosquito larvicide on mallard ducklings and prey. *Wildlife Society Bulletin*, 30: 675-682.
- Miller PJ, Decanini EL and Afonso CL. 2010. Newcastle disease: Evolution of genotypes and the related diagnostic challenges. *Infection, Genetics and Evolution*, 10: 26-35. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2009.09.012>
- Miller PJ, Kim LM, Ip HS and Afonso CL. 2009. Evolutionary dynamics of Newcastle disease virus. *Virology*, 391: 64-72. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2009.05.033>

- Minot S, Sinha R, Chen J, Li H, Keilbaugh SA, Wu GD, Lewis JD and Bushman FD. 2011. The human gut virome: inter-individual variation and dynamic response to diet. *Genome Research*, 21: 1616-1625. doi:10.1101/gr.122705.111
- Mitsch W and Hernandez ME. 2013. Landscape and climate change threats to wetlands of North and Central America. *Aquatic Sciences*, 75: 133-149. doi:10.1007/s00027-012-0262-7
- Mitsch WJ and Gosselink JG. 1986. *Wetlands*: Van Nostrand Reinhold Company.
- Mitsch WJ and Gosselink JG. 2015. *Wetlands*, New Jersey, USA: John Wiley & Sons Inc.
- Mizuno CM, Rodriguez-Valera F, Kimes NE and Ghai R. 2013. Expanding the Marine Virosphere Using Metagenomics. *PLoS Genetics*, 9: e1003987. doi:10.1371/journal.pgen.1003987
- Mohiuddin M and Schellhorn HE. 2015. Spatial and temporal dynamics of virus occurrence in two freshwater lakes captured through metagenomic analysis. *Frontiers in Microbiology*, 6: 960. doi:10.3389/fmicb.2015.00960
- Mokili JL, Rohwer F and Dutilh BE. 2012. Metagenomics and future perspectives in virus discovery. *Current Opinion in Virology*, 2: 63-77. doi:10.1016/j.coviro.2011.12.004
- Motooka D, Nakamura S, Hagiwara K and Nakaya T. 2015. Viral detection by high-throughput sequencing. *Methods in Molecular Biology*, 1236: 125-134. doi:10.1007/978-1-4939-1743-3\_11
- Nair V and Fadly AM. 2013. Neoplastic Diseases. Leukosis/Sarcoma Group. In: Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, et al. (eds) *Diseases of Poultry*. 13th ed.: John Wiley & Sons, Inc., 553-592.
- Nair V, Zavala G and Fadly AM. 2013. Neoplastic Diseases. Reticuloendotheliosis. In: Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, et al. (eds) *Diseases of Poultry*. John Wiley & Sons, Inc., 593-604.
- Navarro-Sigüenza AG, Rebón-Gallardo MF, Gordillo-Martínez A, Peterson AT, Berlanga-García H and Sánchez-González LA. 2014. Biodiversidad de aves en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85: 476-495. doi:https://doi.org/10.7550/rmb.41882
- Nielsen AA, Jensen TH, Stockmarr A and Jorgensen PH. 2013. Persistence of low-pathogenic H5N7 and H7N1 avian influenza subtypes in filtered natural waters. *Veterinary Microbiology*, 166: 419-428. doi:10.1016/j.vetmic.2013.06.024
- Nummi P, Sjöberg K, Pöysä H and Elmberg J. 2000. Individual foraging behaviour indicates resource limitation: an experiment with mallard ducklings. *Canadian Journal of Zoology*, 78: 1891-1895. doi:10.1139/z00-142
- Nyman JA. 2011. Ecological Functions of Wetlands. In: LePage BA (ed) *Wetlands: Integrating Multidisciplinary Concepts*. Dordrecht: Springer Netherlands, 115-128.
- Olsen B, Munster VJ, Wallensten A, Waldenstrom J, Osterhaus AD and Fouchier RA. 2006. Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science*, 312: 384-388. doi:10.1126/science.1122438

- Olson SH, Parmley J, Soos C, Gilbert M, Latorre-Margalef N, Hall JS, Hansbro PM, Leighton F, Munster V and Joly D. 2014. Sampling strategies and biodiversity of influenza A subtypes in wild birds. *PLoS One*, 9: e90826. doi:10.1371/journal.pone.0090826
- Ornelas-Eusebio E, Obregon-Ascencio A, Chavez-Maya F and Garcia-Espinosa G. 2015. Molecular characterization of an influenza A virus (H4N2) isolated from waterfowl habitats in the State of Mexico. *Journal of Veterinary Medical Science*, 77: 365-369. doi:10.1292/jvms.14-0267
- Pasupalati N, Nath M, Sharan A, Narayanan P, Bhatta R, Ramachandran R and Ramachandran P. 2017. Economic Valuation of Wetland Ecosystem Goods and Services. In: Prusty BAK, Chandra R and Azeez PA (eds) *Wetland Science : Perspectives From South Asia*. New Delhi: Springer India, 259-284.
- Pfitzer S, Verwoerd DJ, Gerdes GH, Labuschagne AE, Erasmus A, Manvell RJ and Grund C. 2000. Newcastle disease and avian influenza A virus in wild waterfowl in South Africa. *Avian Diseases*, 44: 655-660.
- Phan TG, Kapusinszky B, Wang C, Rose RK, Lipton HL and Delwart EL. 2011. The fecal viral flora of wild rodents. *PLoS Pathogens*, 7: e1002218. doi:10.1371/journal.ppat.1002218
- Poonia B, Dunn PA, Lu H, Jarosinski KW and Schat KA. 2006. Isolation and molecular characterization of a new Muscovy duck parvovirus from Muscovy ducks in the USA. *Avian Pathology*, 35: 435-441. doi:10.1080/03079450601009563
- Proctor VW. 1968. Long-Distance Dispersal of Seeds by Retention in Digestive Tract of Birds. *Science*, 160: 321.
- Qiu Y, Chen J-M, Wang T, Hou G-Y, Zhuang Q-Y, Wu R and Wang K-C. 2017. Detection of viromes of RNA viruses using the next generation sequencing libraries prepared by three methods. *Virus Research*, 237: 22-26. doi:https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.05.003
- Radford AD, Chapman D, Dixon L, Chantrey J, Darby AC and Hall N. 2012. Application of next-generation sequencing technologies in virology. *Journal of General Virology*, 93: 1853-1868. doi:10.1099/vir.0.043182-0
- Ramey AM, Pearce JM, Ely CR, Sheffield Guy LM, Irons DB, Derksen DV and Ip HS. 2010. Transmission and reassortment of avian influenza viruses at the Asian–North American interface. *Virology*, 406: 352-359. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2010.07.031
- Ramey AM, Reeves AB, Ogawa H, Ip HS, Imai K, Bui VN, Yamaguchi E, Silko NY and Afonso CL. 2013. Genetic diversity and mutation of avian paramyxovirus serotype 1 (Newcastle disease virus) in wild birds and evidence for intercontinental spread. *Archives of Virology*, 158: 2495-2503. doi:10.1007/s00705-013-1761-0
- Ramsar Convention Secretariat. 1971. *Convention on Wetlands of International Importance Especially as Waterfowl Habitat*. Available: [https://www.ramsar.org/sites/default/files/documents/library/current\\_convention\\_text\\_e.pdf](https://www.ramsar.org/sites/default/files/documents/library/current_convention_text_e.pdf) [Accessed July, 2018].



Ramsar Convention Secretariat. 2010. *Wetland inventory: A Ramsar framework for wetland inventory and ecological character description*

Ramsar Convention Secretariat. 2016. *An Introduction to the Ramsar Convention on Wetlands*

Ramsar Convention Secretariat. 2018a. *About the Ramsar Convention*. Available at: <https://www.ramsar.org/about-the-ramsar-convention>.

Ramsar Convention Secretariat. 2018b. *Annotated List of Wetlands of International Importance*. Available: [https://rsis.ramsar.org/sites/default/files/rsiswp\\_search/exports/Ramsar-Sites-annotated-summary-Mexico.pdf?1542817840](https://rsis.ramsar.org/sites/default/files/rsiswp_search/exports/Ramsar-Sites-annotated-summary-Mexico.pdf?1542817840) [Accessed July, 2018].

Ramsar Convention Secretariat. 2018c. *The List of Wetlands of International Importance*. 2018. Available: <https://www.ramsar.org/sites/default/files/documents/library/sitelist.pdf> [Accessed July, 2018].

Robles-Sikisaka R, Ly M, Boehm T, Naidu M, Salzman J and Pride DT. 2013. Association between living environment and human oral viral ecology. *The Isme Journal*, 7: 1710. doi:10.1038/ismej.2013.63  
<https://www.nature.com/articles/ismej201363#supplementary-information>

Sachsenroder J, Braun A, Machnowska P, Ng TF, Deng X, Guenther S, Bernstein S, Ulrich RG, Delwart E and Johne R. 2014. Metagenomic identification of novel enteric viruses in urban wild rats and genome characterization of a group A rotavirus. *Journal of General Virology*, 95: 2734-2747. doi:10.1099/vir.0.070029-0

Sachsenröder J, Twardziok SO, Scheuch M and Johne R. 2014. The General Composition of the Faecal Virome of Pigs Depends on Age, but Not on Feeding with a Probiotic Bacterium. *PloS One*, 9: e88888. doi:10.1371/journal.pone.0088888

Salmier A, Tirera S, de Thoisy B, Franc A, Darcissac E, Donato D, Bouchier C, Lacoste V and Lavergne A. 2017. Virome analysis of two sympatric bat species (*Desmodus rotundus* and *Molossus molossus*) in French Guiana. *PloS One*, 12: e0186943. doi:10.1371/journal.pone.0186943

Samuel AS, Paldurai A, Kumar S, Collins PL and Samal SK. 2010. Complete genome sequence of avian paramyxovirus (APMV) serotype 5 completes the analysis of nine APMV serotypes and reveals the longest APMV genome. *PloS One*, 5: e9269. doi:10.1371/journal.pone.0009269

Sanchez S, França M and Nemeth NM. 2016. Microbiological Hazards of Wild Birds and Free-Range Chickens. In: Jay-Russell M and Doyle MP (eds) *Food Safety Risks from Wildlife: Challenges in Agriculture, Conservation, and Public Health*. Cham: Springer International Publishing, 89-130.

Sano E, Carlson S, Wegley L and Rohwer F. 2004. Movement of Viruses between Biomes. *Appl Environ Microbiol*, 70: 5842-5846. doi:10.1128/AEM.70.10.5842-5846.2004

Schmieder R and Edwards R. 2011. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*, 27: 863-864. doi:10.1093/bioinformatics/btr026

- Schmieder R, Lim YW and Edwards R. 2012. Identification and removal of ribosomal RNA sequences from metatranscriptomes. *Bioinformatics*, 28: 433-435. doi:10.1093/bioinformatics/btr669
- Scholz M. 2011. Introduction to Wetland Systems. *Wetland Systems: Storm Water Management Control*. London: Springer London, 1-17.
- SEMARNAT. 2008. *Estrategia para la conservación, manejo y aprovechamiento de las aves acuáticas y su hábitat en México*, Ciudad de México, México: Dirección General de Vida Silvestre.
- SEMARNAT. 2017. *Plan de manejo tipo para la conservación y aprovechamiento sustentable de aves acuáticas y playeras*, Ciudad de México, México: Dirección General de Vida Silvestre.
- Shah JD, Baller J, Zhang Y, Silverstein K, Xing Z and Cardona CJ. 2014. Comparison of tissue sample processing methods for harvesting the viral metagenome and a snapshot of the RNA viral community in a turkey gut. *Journal of Virological Methods*, 209: 15-24. doi:10.1016/j.jviromet.2014.08.011
- Shah JD, Desai PT, Zhang Y, Scharber SK, Baller J, Xing ZS and Cardona CJ. 2016. Development of the Intestinal RNA Virus Community of Healthy Broiler Chickens. *PloS One*, 11: e0150094. doi:10.1371/journal.pone.0150094
- Sharp GB, Kawaoka Y, Jones DJ, Bean WJ, Pryor SP, Hinshaw V and Webster RG. 1997. Coinfection of wild ducks by influenza A viruses: distribution patterns and biological significance. *Journal of Virology*, 71: 6128-6135.
- Shoham D, Jahangir A, Ruenphet S and Takehara K. 2012. Persistence of avian influenza viruses in various artificially frozen environmental water types. *Influenza Res Treat*, 2012: 912326. doi:10.1155/2012/912326
- Siti-Zahrah A, Zamri-Saad M, Firdaus-Nawi M, Hazreen-Nita MK and Nur-Nazifah M. 2014. Detection of channel catfish virus in cage-cultured *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage, 1878) in Malaysia. *Journal of Fish Diseases*, 37: 981-983. doi:10.1111/jfd.12185
- Smits SL, Raj VS, Oduber MD, Schapendonk CM, Bodewes R, Provacía L, Stittelaar KJ, Osterhaus AD and Haagmans BL. 2013. Metagenomic analysis of the ferret fecal viral flora. *PloS One*, 8: e71595. doi:10.1371/journal.pone.0071595
- Soike D, Albrecht K, Hattermann K, Schmitt C and Mankertz A. 2004. Novel circovirus in mulard ducks with developmental and feathering disorders. *Veterinary Record*, 154: 792-793.
- Stallknecht DE, Kearney MT, Shane SM and Zwank PJ. 1990a. Effects of pH, temperature, and salinity on persistence of avian influenza viruses in water. *Avian Diseases*, 34: 412-418.
- Stallknecht DE and Shane SM. 1988. Host range of avian influenza virus in free-living birds. *Vet Res Commun*, 12: 125-141.
- Stallknecht DE, Shane SM, Kearney MT and Zwank PJ. 1990b. Persistence of avian influenza viruses in water. *Avian Diseases*, 34: 406-411.

- Subbiah M, Nayak S, Collins PL and Samal SK. 2010. Complete genome sequences of avian paramyxovirus serotype 2 (APMV-2) strains Bangor, England and Kenya: Evidence for the existence of subgroups within serotype 2. *Virus Research*, 152: 85-95. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2010.06.009
- Takase K, Nonaka F, Sakaguchi M and Yamada S. 1986. Cytopathic avian rotavirus isolated from duck faeces in chicken kidney cell cultures. *Avian Pathology*, 15: 719-730. doi:10.1080/03079458608436334
- Takehara K, Kiuchi H, Kuwahara M, Yanagisawa F, Mizukami M, Matsuda H and Yoshimura M. 1991. Identification and characterization of a plaque forming avian rotavirus isolated from a wild bird in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 53: 479-486.
- Teo SS. 2001. Evaluation of different duck varieties for the control of the golden apple snail (*Pomacea canaliculata*) in transplanted and direct seeded rice. *Crop Protection*, 20: 599-604. doi:https://doi.org/10.1016/S0261-2194(01)00029-1
- Ullmann LS, de Camargo Tozato C, Malossi CD, da Cruz TF, Cavalcante RV, Kurissio JK, Cagnini DQ, Rodrigues MV, Biondo AW and Araujo JP, Jr. 2015. Comparative clinical sample preparation of DNA and RNA viral nucleic acids for a commercial deep sequencing system (Illumina MiSeq((R))). *Journal of Virological Methods*, 220: 60-63. doi:10.1016/j.jviromet.2015.04.009
- Vazquez Rivera H. 2004. *Preferencias de habitat por la avifauna presente en la Laguna Chimaliapan, Cienagas de Lerma, Lerma, Estado de Mexico*. (Maestría en Ciencias Biológicas), Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Ciudad de México, México.
- Victoria JG, Kapoor A, Li L, Blinkova O, Slikas B, Wang C, Naeem A, Zaidi S and Delwart E. 2009. Metagenomic analyses of viruses in stool samples from children with acute flaccid paralysis. *Journal of Virology*, 83: 4642-4651. doi:10.1128/jvi.02301-08
- Wallensten A, Munster VJ, Latorre-Margalef N, Brytting M, Elmberg J, Fouchier RA, Fransson T, Haemig PD, Karlsson M, Lundkvist A, Osterhaus AD, Stervander M, Waldenstrom J and Bjorn O. 2007. Surveillance of influenza A virus in migratory waterfowl in northern Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 13: 404-411. doi:10.3201/eid1303.061130
- Wang KC, Chen GQ, Jiang WM, Liu S, Hou GY, Yu JM, Li JP, Zhuang QY and Chen JM. 2013. Complete genome sequence of a hemagglutination-negative avian paramyxovirus type 4 isolated from china. *Genome Announc*, 1: e0004513. doi:10.1128/genomeA.00045-13
- Warke A, Stallknecht D, Williams SM, Pritchard N and Mundt E. 2008. Comparative study on the pathogenicity and immunogenicity of wild bird isolates of avian paramyxovirus 2, 4, and 6 in chickens. *Avian Pathology*, 37: 429-434. doi:10.1080/03079450802216645
- Webby RJ, Webster RG and Richt JA. 2007. Influenza viruses in animal wildlife populations. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 315: 67-83.
- Webster RG. 1998. Influenza: an emerging disease. *Emerging Infectious Diseases*, 4: 436-441. doi:10.3201/eid0403.980325

- Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM and Kawaoka Y. 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological Reviews*, 56: 152-179.
- Webster RG, Yakhno M, Hinshaw VS, Bean WJ and Murti KG. 1978. Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology*, 84: 268-278.
- Welsh R, Che J, Brehm M and Selin L. 2010. Heterologous immunity between viruses. *Immunological Reviews*, 235: 244-266. doi:doi:10.1111/j.0105-2896.2010.00897.x
- Wille M, Tolf C, Avril A, Latorre-Margalef N, Wallerstrom S, Olsen B and Waldenstrom J. 2013. Frequency and patterns of reassortment in natural influenza A virus infection in a reservoir host. *Virology*, 443: 150-160. doi:10.1016/j.virol.2013.05.004
- Willner D and Hugenholtz P. 2013. From deep sequencing to viral tagging: recent advances in viral metagenomics. *Bioessays*, 35: 436-442. doi:10.1002/bies.201200174
- Wolf Y, Krupovic M, Zhang YZ, Maes P, Dolja V, Koonin EV and Kuhn JH. 2017. *Megataxonomy of negative-sense RNA viruses*. Available: [https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode\\_id=20183956](https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=20183956) [Accessed July, 2018].
- Wommack KE and Colwell RR. 2000. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64: 69-114.
- Wood DE and Salzberg SL. 2014. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biology*, 15: R46. doi:10.1186/gb-2014-15-3-r46
- Xiao S, Subbiah M, Kumar S, De Nardi R, Terregino C, Collins PL and Samal SK. 2010. Complete genome sequences of avian paramyxovirus serotype 6 prototype strain Hong Kong and a recent novel strain from Italy: Evidence for the existence of subgroups within the serotype. *Virus Research*, 150: 61-72. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2010.02.015
- Yu K, Li Y, Han H, Song M, Ma X, Liu C, Huang B and Li F. 2014. Complete genome sequence of an avian reovirus isolated from wild mallard ducks in china. *Genome Announc*, 2. doi:10.1128/genomeA.00813-14
- Zeng X, Liu L, Hao R and Han C. 2014. Detection and Molecular Characterization of J Subgroup Avian Leukosis Virus in Wild Ducks in China. *PloS One*, 9: e94980. doi:10.1371/journal.pone.0094980
- Zhang W, Li L, Deng X, Kapusinszky B, Pesavento PA and Delwart E. 2014. Faecal virome of cats in an animal shelter. *Journal of General Virology*, 95: 2553-2564. doi:10.1099/vir.0.069674-0
- Zhang Y, Liu M, Shuidong O, Hu QL, Guo DC, Chen HY and Han Z. 2006. Detection and identification of avian, duck, and goose reoviruses by RT-PCR: goose and duck reoviruses are part of the same genogroup in the genus Orthoreovirus. *Archives of Virology*, 151: 1525-1538. doi:10.1007/s00705-006-0731-1
- Zhao L, Niu Y, Lu T, Yin H, Zhang Y, Xu L, Wang Y and Chen H. 2018. Metagenomic Analysis of the Jinding Duck Fecal Virome. *Current Microbiology*, 75: 658-665. doi:10.1007/s00284-018-1430-3

Ziegler U, Seidowski D, Globig A, Fereidouni SR, Ulrich RG and Groschup MH. 2010. Sentinel birds in wild-bird resting sites as potential indicators for West Nile virus infections in Germany. *Archives of Virology*, 155: 965-969. doi:10.1007/s00705-010-0618-z