



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**ESTIMACIÓN DE LA PREVALENCIA Y DETERMINACIÓN DE LA
VARIACIÓN ESTACIONAL DEL VIRUS INFLUENZA A EN EL
HUMEDAL PARQUE LA ISLA, CONCÓN, CHILE**

Gabriela Paulina Boldt Corvalán

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina Preventiva

PROFESOR GUÍA: DR. CHRISTOPHER HAMILTON-WEST

Financiamiento: NIAID HHSN272201400006C

SANTIAGO, CHILE
2018



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**ESTIMACIÓN DE LA PREVALENCIA Y DETERMINACIÓN DE LA
VARIACIÓN ESTACIONAL DEL VIRUS INFLUENZA A EN EL
HUMEDAL PARQUE LA ISLA, CONCÓN, CHILE**

Gabriela Paulina Boldt Corvalán

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de Medicina Preventiva

Nota Final

Prof. Guía	Christopher Hamilton-West
Profesor Corrector	José Manuel Yáñez
Profesor Corrector	Pedro Ábalos

SANTIAGO, CHILE
2018

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por ser el pilar que sustenta mi vida, el aliento que me da las fuerzas y quien hace que cada paso cobre sentido.

A mi familia, especialmente mis padres, quienes han dedicado toda su paternidad a este momento, a ver a sus hijos realizados y preparados para emprender el vuelo, gracias por su amor e incondicional apoyo.

Al CENTI, por encaminarme en la búsqueda de Dios y poner personas que fueron fundamentales para enfrentar este proceso universitario.

A la familia Fuentes Villalobos, mi “familia santiaguina”, su apoyo y cariño mitigaron los prejuicios que (como buena chilena de región) tenía hacia la gente de Santiago, gracias por hacerme sentir como en casa.

A mis amigos, de la universidad y de la vida, darnos ánimo mutuamente en esta etapa, una de las más importantes de nuestras vidas, nos ha llevado a forjar una amistad sobre la roca que permanecerá a través del tiempo.

Al equipo de Epidemiología FAVET, sin ellos sencillamente no podría haber realizado esta memoria, gracias por enseñarme con paciencia y cariño, hoy los llevo en mi corazón como amigos más que compañeros.

“¡Sé fuerte y valiente!

No tengas miedo ni te desanimes, porque el Señor tu Dios está contigo dondequiera que vayas”. Josué 1:9

ÍNDICE

RESUMEN	IV
ABSTRACT.....	V
INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	2
Virus Influenza tipo A	2
Epidemiología de los VIA	2
Situación Internacional	3
Situación Nacional.....	4
Importancia de los Humedales frente a la presencia de VIA.....	5
HIPÓTESIS.....	7
OBJETIVO GENERAL	7
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
MATERIALES Y MÉTODOS	8
Zona de Estudio y Población Objetivo	8
<i>Medidas de Bioseguridad.....</i>	8
Objetivo N°1: Identificar la presencia de VIA y su prevalencia mensual en el HPLI de Concón.	8
<i>Análisis de laboratorio.....</i>	8
<i>Análisis de los resultados.....</i>	9
Objetivo N°2: Determinar relación entre resultados obtenidos y estacionalidad:	10
RESULTADOS	11
Objetivo N°1: Identificar la presencia de VIA y su prevalencia mensual en el HPLI de Concón.	11
Objetivo N°2: Determinar relación entre resultados obtenidos y estacionalidad	12
DISCUSIÓN	13
Objetivo N°1: Identificar la presencia de VIA y su prevalencia mensual en el HPLI de Concón.	13
Objetivo N°2: Determinar relación entre resultados obtenidos y estacionalidad	17
CONCLUSIÓN	19
BIBLIOGRAFÍA	20

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla Nro. 1: Primers para la detección del gen M.....	9
Tabla Nro. 2: Resultados de análisis mediante prueba RT-qPCR de heces de aves silvestres presentes en el HPLI, promedio, intervalo valores Ct y Desviación estándar (DS) de valores Ct de muestras positivas en los meses muestreados durante el período de octubre 2015–agosto 2016.	11
Tabla Nro. 3: Resultados de análisis mediante prueba RT-qPCR de heces de aves silvestres presentes en el HPLI y porcentajes de prevalencia en los meses muestreados durante el período de octubre 2015–agosto 2016.	12
Tabla Nro. 4: Resultados de regresión logística simple para asociación entre positividad a VIA y estacionalidad PV 2015-2016 en el HPLI.	12
Tabla Nro. 5: Resultados de regresión logística simple para asociación entre positividad a VIA y estacionalidad VO 2016 en el HPLI.	13
Tabla Nro. 6: Valores de temperaturas medias, precipitación total diaria y mensual y HR para los días muestreados durante el período de octubre 2015–agosto 2016, estación Rodelillo.....	16

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

CDC: Centers for Disease Control and Prevention.

CFSPH: Center for Food Security and Public Health.

Ct: Ciclo umbral (cycle threshold).

DS: Desviación estándar.

ENOS: El Niño Oscilación Sur.

EpiFAVET: Epidemiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

FAO: Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura.

FAVET: Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

HA: Hemaglutinina.
HPLI: Humedal Parque La Isla.
HR: Humedad Relativa.
IA: Influenza Aviar.
IAAP: Influenza Aviar de Alta Patogenicidad.
IABP: Influenza Aviar de Baja Patogenicidad.
IAV: Influenza A Viruses.
I.C.I.: Intervalo de Confianza Inferior.
I.C.S.: Intervalo de Confianza Superior.
LIPW: La Isla Park Wetland.
METEOCHILE: Dirección meteorológica de Chile.
MHNV: Museo de Historia Natural de Valparaíso.
mm: milímetros.
NA: Neuraminidasa.
nm: nanómetros.
O.R.: Odds ratio.
OI: Otoño-Invierno.
OIE: Organización mundial para la salud animal.
OMS: Organización mundial de la salud.
PV: Primavera -Verano.
RNA: Ácido Ribonucleico.
RT-qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa.
SAG: Servicio agrícola y ganadero.
SHOA: Servicio hidrográfico y oceanográfico de la Armada.
UV: Ultravioleta.
VI: Virus Influenza.
VIA: Virus Influenza tipo A.
VO: Verano-Otoño.

RESUMEN

Los virus influenza tipo A (VIA) afectan a una gran cantidad de especies incluyendo seres humanos. Se reconoce a las aves silvestres como el principal reservorio de estos virus, particularmente aquellas pertenecientes a los órdenes *Anseriformes* y *Charadriiformes*, motivo por el cual resulta de gran importancia entender la dinámica de los VIA en estas poblaciones animales. Al respecto existe gran cantidad de información en países del hemisferio norte en el continente americano, situación que difiere de los países de Sudamérica. El presente estudio consistió en el desarrollo de actividades de vigilancia activa de los VIA durante el período de octubre 2015-agosto 2016 en las aves silvestres del Humedal Parque La Isla (HPLI) de la localidad de Concón, Chile. El objetivo de esta memoria fue determinar la presencia del virus, sus niveles de prevalencia y una posible estacionalidad de estos valores en el HPLI. Se tomó un total de 1.432 muestras de heces de aves, las cuales fueron analizadas mediante el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa con Transcriptasa Reversa (RT-qPCR) para detectar el gen M del VIA. De esta manera se identificó la presencia del virus en el 75% de los meses estudiados, con una prevalencia total de 4,26%, donde el valor mínimo observado fue un 1,04% para los meses de marzo y julio, y un 14,58% en abril. También se logró establecer una asociación entre positividad a VIA y una estacionalidad en Verano-Otoño (VO) 2016 ($p = 0,0004$) por medio del modelo de Regresión Logística Simple, existiendo 3,02 veces más riesgo de encontrar positividad al virus mediante la prueba RT-qPCR durante los meses de esta temporada. Finalmente se pudo concluir que muchos factores no considerados en el estudio pudieron haber influido sobre estos resultados, tales como la especie a la que pertenecían las muestras y las variables climáticas, entre otras. También se pudo dilucidar la existencia de una gran brecha de información en países como Chile y la región de Sudamérica en general respecto a los VIA, es así como el presente estudio podría dar pie a futuras investigaciones que incorporen múltiples factores para llegar a comprender a mayor cabalidad la dinámica de los VIA en las poblaciones de aves silvestres de humedales como el HPLI de Concón.

Palabras clave: Virus Influenza tipo A, Aves Silvestres, Prevalencia, Estacionalidad.

ABSTRACT

Influenza A viruses (VIA) affect a large number of species including humans. Wild birds are recognized as the main reservoir of these viruses, particularly those belonging to the orders Anseriformes and Charadriiformes, which is why it is very important to understand the dynamics of VIA in these animal populations. In this regard there is a great amount of information in countries of the Northern hemisphere in the American continent, a situation that differs from the countries of South America. The present study consisted of the development of active surveillance activities of the VIA during the period of October 2015-August 2016 in the wild birds of the La Isla Park Wetland (HPLI) of the town of Concón, Chile. The objective of this report was to determine the presence of the virus, its prevalence levels and a possible seasonality of these values in the HPLI. A total of 1432 samples of feces of birds were taken, which were analyzed by the Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR) method to detect the M gene of VIA. In this way, the presence of the virus was identified in 75% of the months studied, with a total prevalence of 4.26%, where the minimum value observed was 1.04% for the months of March and July, and 14.58% in April. It was also possible to establish an association between VIA positivity and seasonality in Summer-Autumn (VO) 2016 ($p = 0.0004$) by means of the Simple Logistic Regression model, being 3.02 times more risk of finding positivity to the virus through the RT-qPCR test during the months of this season. Finally, it was concluded that many factors not considered in the study could have influenced these results, such as the species to which the samples belonged and the climatic variables, among others. It was also possible to elucidate the existence of a large information gap in countries such as Chile and the South American region in general with respect to VIA, this is how the present study could lead to future research that incorporates multiple factors to reach a greater understanding of the dynamics of VIA in wild bird populations of wetlands such as Concón's HPLI.

Keywords: Influenza A Viruses, Wild Birds, Prevalence, Seasonality.

INTRODUCCIÓN

Los Virus Influenza tipo A (VIA) son de gran importancia para la salud pública y animal, ya que generan enfermedad en una amplia variedad de especies con la posibilidad de transmitirse entre ellas. En la historia humana han estado presentes causando epidemias anuales y esporádicas, tales como la “Gripe Española” del año 1918 o la pandemia de influenza A (H1N1) ocurrida el 2009. En poblaciones animales destaca la enfermedad que generan en aves de corral, donde variantes de alta patogenicidad de este virus, han provocado efectos devastadores en las poblaciones afectadas de diversos lugares del mundo.

Se reconoce a las aves silvestres como reservorios naturales de los VIA, principalmente aquellas pertenecientes a los órdenes *Anseriformes* y *Charadriiformes*, siendo los mayores contribuyentes a su diseminación a través de sus movimientos poblacionales como las migraciones estacionales que algunas de estas aves ejecutan. Se han llevado a cabo diversos estudios para determinar el estado y la presencia del virus en aves silvestres y así prevenir consecuencias futuras que podrían afectar a otras especies. Sin embargo, la mayor cantidad de estas investigaciones han sido realizadas durante décadas en países del hemisferio norte del continente americano, existiendo una gran carencia de información respecto a esta situación en el hemisferio sur, donde el primer aislado del virus en aves silvestres se realizó en Bolivia el año 2001.

Chile es el único país de Sudamérica que registró un brote de una variante de alta patogenicidad en aves de corral, el año 2002 en la Región de Valparaíso, cuyo origen se plantea estar vinculado a aves silvestres aledañas a los planteles productivos afectados. Por otra parte, durante los últimos años se han observado brotes de enfermedad producida por los VIA en aves silvestres en Estados Unidos y México, países con los cuales Chile comparte rutas migratorias de algunas de sus aves silvestres. El Humedal Parque La Isla (HPLI), de la localidad de Concón, Región de Valparaíso, es un sitio en el que anualmente se reconocen alrededor de 80 especies de aves silvestres, de las cuales aproximadamente un 9% son migratorias inter hemisféricas. El presente estudio pretende determinar si existe presencia de VIA en este humedal, medir su prevalencia y evaluar su variación estacional durante el período de octubre 2015-agosto 2016.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Virus Influenza tipo A

Los Virus Influenza (VI) pertenecen a la familia Orthomyxoviridae, dentro de la cual se identifican cuatro tipos de virus: A, B, C y D, este último recientemente identificado en bovinos (White *et al.*, 2016). Los tipos B y C son encontrados preferentemente en los seres humanos causando enfermedad leve (Valladares, 2015). Mientras que, en aves, es el tipo A el causante de la enfermedad, aunque también afecta a una gran variedad de mamíferos, incluidos los seres humanos (Webster *et al.*, 1992).

En la historia humana, los VIA han sido la causa de grandes pandemias como la denominada “Gripe Española” de 1918, generada por un VIA (H1N1) de origen aviar, describiéndose como la peor pandemia de influenza de la historia (Ilizástiguir y Rodríguez, 2010). Posteriormente se presentó la “Gripe Asiática”, en 1957, provocada por un VIA (H2N2), luego la “Gripe de Hong Kong”, en 1968, causada por el VIA (H3N2) (Acuña, 2004). Finalmente, el año 2009 se produce un brote en México causado por un nuevo VIA (H1N1) de origen porcino, que anteriormente no había generado enfermedad en seres humanos, dando origen a la primera influenza pandémica del siglo XXI, la denominada “Gripe porcina”, que en los primeros casos registró tasas de mortalidad de hasta un 9% (Rabagliati *et al.*, 2011).

El VIA es un virus RNA, de 8 segmentos, pleomórfico con un tamaño que oscila entre los 80-120 nm de diámetro (Spackman, 2008). Además, es un virus envuelto conformado por una bicapa lipídica en la cual se ubican dos glicoproteínas de superficie: HA y NA, las cuales permiten clasificar al VIA en diferentes subtipos, existiendo hasta la fecha 16 subtipos H (desde H1 a H16) y 9 subtipos N (desde N1 a N9) circulando en aves silvestres y mamíferos, pero recientemente se encontraron nuevos subtipos H17N10 y H18N11 descritos solo en murciélagos (CDC, 2014a).

Epidemiología de los VIA

Los principales reservorios naturales de los VIA son las aves silvestres, en particular aquellas aves relacionadas a ambientes acuáticos pertenecientes a los órdenes *Anseriformes* (principalmente patos, gansos y cisnes) y *Charadriiformes* (gaviotas, gaviotines y playeros) (Olsen, *et al.*, 2006).

Los mayores niveles de prevalencia de VIA en aves silvestres predominan durante los meses previos a las migraciones de las aves. Particularmente en aves playeras, se observa un aumento de prevalencia durante los meses de primavera (Webster *et al.*, 1992).

Las aves portan los VIA en su tracto digestivo y respiratorio, presentando la infección, pero no necesariamente desarrollan enfermedad, identificándose como portadores asintomáticos. De esta forma, pueden transmitir los virus a través de la saliva, secreciones nasales y heces, o a través de fómites y así infectar a las aves domésticas como gallinas, patos, pavos y otras especies (CDC, 2014b). En aves, estos virus pueden provocar la enfermedad Influenza Aviar (IA), la cual puede presentarse mediante dos formas; alta y baja patogenicidad (IAAP e IABP, respectivamente). Las aves silvestres por lo general portan subtipos de IABP, las que les generan síntomas leves como plumaje erizado, disminución en la producción de huevos, o leves problemas respiratorios. Sin embargo, se ha observado que al entrar en contacto con aves de corral podrían mutar a una cepa de IAAP, generando efectos devastadores, que podrían llegar a producir la muerte de hasta el 100% de las aves dentro de las primeras 48 horas post infección (OIE, 2016). Hasta la fecha, solo algunos subtipos H5 y H7 han estado asociados a los casos de IAAP (CFSPH, 2010).

En los seres humanos los virus de la IA se transmiten por contacto directo con aves infectadas, no dando lugar a una transmisión eficiente entre personas. Generan enfermedad de manera esporádica, donde se observan síntomas como conjuntivitis o enfermedad respiratoria leve. Sin embargo, existen casos de enfermedad grave o incluso muertes asociadas a estos virus de origen aviar (CFSPH, 2010). Las personas suelen contraer principalmente los virus de la IA de los subtipos A(H5N1), A(H7N9) y A(H9N2). A modo de ejemplo, el año 1997 en Hong Kong varios cientos de personas se contagiaron del VIA (H5N1) transmitido directamente desde las aves afectadas y provocando varios casos de defunciones (OMS, 2016). Por estos motivos se realiza vigilancia de los VIA de origen aviar en los sectores de Medio Oriente y Sudeste Asiático, lugares en que se han registrado casos de otros subtipos afectando a poblaciones humanas, tal es el caso de China, país que en los últimos años ha experimentado resultados fatales provocados por IABP A(H5N6) (Pan *et al.*, 2016). Entre los seres humanos, actualmente se encuentran dos subtipos de VIA generando enfermedad, el subtipo A H3N2 y el subtipo A H1N1 pandémico del año 2009 (OMS, 2017).

Situación Internacional

Durante los últimos cinco años se registró una gran cantidad de reportes de IAAP en aves silvestres de las regiones de Europa, Asia y Norteamérica, mientras que Sudamérica permaneció libre de esta situación en aquel período (FAO, 2017). En cuanto a estudios de los VIA en aves silvestres, el hemisferio norte cuenta con una gran cantidad de información, donde algunas investigaciones datan incluso desde la década del 70. A modo general, estas investigaciones describen niveles de prevalencia que van desde un 0,25% hasta un 30% a lo largo de todo el año en diversas poblaciones de aves silvestres (Webster *et al.*, 1992). A diferencia de esto, en la región de Sudamérica, aún existe mucho por investigar y descubrir puesto que las investigaciones en el sector se han llevado a cabo desde tiempos muy recientes. Un ejemplo de esto es el caso de Bolivia, donde el año 2001 se logró el primer aislado de VIA a partir de un ave silvestre, siendo el primero de la región (Spackman *et al.*, 2006). Desde entonces se han comenzado a realizar investigaciones que han encontrado el virus en aves silvestres en países como Perú, Colombia, Argentina, Brasil y Chile, con prevalencias que no superan el 4% (Karlsson *et al.*, 2013; Afanador-Villamizar *et al.*, 2017).

Situación Nacional

En Chile se describen alrededor de 470 especies de aves (Jaramillo, 2005), de las cuales 133 corresponden a aves acuáticas. De estas últimas, la mayor cantidad de especies corresponde al Orden *Charadriiformes* (51 especies) las que se encuentran principalmente en ambientes estuarinos (desembocaduras de ríos), seguido por el Orden *Anseriformes* (29 especies), los que se ubican mayoritariamente en ambientes de aguas interiores. Del total de aves acuáticas, se considera que 91 especies son residentes en Chile, 29 se registran de manera esporádica y 13 son visitantes regulares, las que llegan durante los meses de primavera y verano (Victoriano *et al.*, 2006).

Durante la temporada de Primavera-Verano (PV) se encuentra la mayor cantidad de aves migratorias en Chile, pertenecientes al orden *Charadriiformes*, las que pueden aumentar la tasa de infección de aves silvestres en el territorio nacional, ya que actuarían como potenciales portadores de los VIA, esperando encontrar mayores niveles de prevalencia durante esta temporada. Estas aves migratorias llegan desde Norteamérica principalmente a través de las rutas del Pacífico y Mississippi, y en menor medida a través de la ruta del Atlántico hacia la zona sur austral del país. Cabe señalar que en Chile no se registran aves pertenecientes al Orden *Anseriformes* que sean migratorias inter hemisféricas (Tala, 2006).

Durante un intervalo de tres años (2007-2009), como parte del sistema de vigilancia establecido por el SAG, se identificaron tres subtipos de VIA en aves silvestres. El subtipo H5N9 en una Gaviota Dominicana en la región de Valparaíso, y los subtipos H13N2 y H13N9 en Gaviotas de Franklin en las regiones de Atacama y Arica y Parinacota respectivamente (Mathieu *et al.*, 2015). Este sistema de vigilancia comprendió un análisis de aproximadamente 9.000 muestras anuales, de las cuales alrededor de un 1,6% (148) correspondieron a muestras provenientes de aves silvestres (SAG, 2014). Por otro lado, en aves domésticas, los VIA han causado brotes de IA en tres ocasiones en el país: el año 2002, 2009 y 2017 (Rojas y Moreira, 2006; Mathieu *et al.*, 2010; SAG, 2017). También se ha determinado la presencia del VIA en sistemas de traspatios en la zona central (Bravo-Vasquez *et al.*, 2016).

Importancia de los Humedales frente a la presencia de VIA

La supervivencia de los VI en el ambiente depende de una serie de factores como temperatura, pH, salinidad y materia orgánica presente y se ha observado que algunos subtipos persisten infecciosos por hasta 4 días en aguas a una temperatura de 22°C (Olsen *et al.*, 2006), particularmente para los virus de baja patogenicidad H5 y H7, se ha observado una persistencia inversamente proporcional a la temperatura y salinidad del agua (Brown *et al.*, 2007). De esta forma se describe una mejor supervivencia de estos virus en ambientes acuáticos y de baja temperatura como los humedales (CFSPH, 2010). Estos constituyen lugares donde existe una alta concentración de aves y una alta tasa de intercambio de estas debido al proceso de migración asociado a algunas especies, facilitando las condiciones para el contagio de enfermedades entre ellas (Beldomenico y Uhart, 2008).

El HPLI resulta un sitio de interés para el estudio de los VIA debido a que reúne una serie de características que podrían favorecer la presencia del virus en el lugar. Este humedal se ubica en la localidad de Concón en la desembocadura del río Aconcagua, Región de Valparaíso, donde ya existen registros de la presencia del virus en aves silvestres (Mathieu *et al.*, 2015). Por otra parte, este ecosistema es altamente diverso, ya que representa un hábitat rico en cuanto a la avifauna presente (Rasek y Riveros, 2006). Es así, como censos oficiales han identificado un mínimo de 500 ejemplares para este sitio en meses de invierno y un máximo aproximado de 2000 individuos en meses de primavera, donde las especies más abundantes son las aves playeras, pertenecientes al orden *Charadriiformes* (SAG, 2012), en las que se

ha observado una mayor prevalencia del VIA durante los meses de primavera en estudios del hemisferio norte (Webster *et al.*, 1992). También se describe una importante presencia de aves migratorias inter hemisféricas, las cuales representan aproximadamente un 9% respecto a la totalidad de especies posibles de avistar en el humedal (80 especies aproximadamente) (MHNV, 2015), las que podrían ser las responsables del ingreso y mantención del virus en dicho sector.

HIPÓTESIS

1. Existe presencia de VIA en el HPLI de Concón.
2. La presencia del VIA tendría variaciones estacionales, existiendo mayores niveles de prevalencia en los meses de primavera y verano austral.

OBJETIVO GENERAL

Estimar la presencia, prevalencia y determinar la variación estacional del VIA en el HPLI de la localidad de Concón entre octubre de 2015 y agosto de 2016.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Identificar la presencia de VIA y su prevalencia mensual en el HPLI de Concón.
2. Determinar relación entre resultados obtenidos y estacionalidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Zona de Estudio y Población Objetivo

La zona en estudio fue el HPLI ubicado en la desembocadura del río Aconcagua, localidad de Concón, Región de Valparaíso, Chile.

Las muestras de heces frescas de aves silvestres presentes en el humedal durante el período de octubre 2015 hasta agosto 2016 constituyeron la población objetivo del presente estudio, las cuales fueron recopiladas por el equipo de la Unidad de EpiFAVET.

El tamaño de muestra mensual fue calculado según el método de muestreo para detectar enfermedad según la siguiente fórmula (Dohoo *et al.*, 2003):

$$n = \frac{\ln \alpha}{\ln q}$$

Donde:

n = Tamaño de muestra

α = 1-nivel de confianza = 0,05.

q = 1-prevalencia mínima esperada = 1,6% (Salman, 2003).

Las muestras fueron almacenadas a -80°C para ser procesadas durante el desarrollo de esta memoria en el Laboratorio de EpiFAVET.

Medidas de Bioseguridad

Para el manejo de las muestras el uso de guantes de nitrilo y delantal fueron obligatorios, también la utilización de reactivos tales como cloro y etanol para limpiar materiales y equipos. Durante el procedimiento de extracción del material genético se contó con el uso de un gabinete de bioseguridad clase II, mientras que, para la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-qPCR), se utilizó una campana de PCR con luz UV. Además, los residuos del proceso fueron dispuestos en bolsas de bioseguridad para ser descontaminados en la sala de autoclave ubicada en el Departamento de Medicina Preventiva de FAVET.

Objetivo N°1: Identificar la presencia de VIA y su prevalencia mensual en el HPLI de Concón.

Análisis de laboratorio

En el presente estudio se realizó un análisis de heces de aves acuáticas presentes en el lugar de la toma de muestras, este tipo de análisis permite evidenciar la presencia y circulación de VIA en la población de estudio, como también los subtipos específicos presentes, niveles de patogenicidad y posibles riesgos para otras especies (Franklin *et al.*, 2009).

Las muestras previamente almacenadas a -80°C fueron descongeladas para ser sometidas al proceso de extracción de RNA, el cual se realizó según los protocolos de Spackman y Suarez (2008), y Spackman y Lee (2014). De esta forma, se obtuvieron purificados de RNA que fueron sometidos al método RT- qPCR, con el objetivo de detectar el gen M (matriz viral) del VIA siguiendo las recomendaciones entregadas por la OMS (2013). La técnica de RT- qPCR presenta los valores más altos de sensibilidad y especificidad para su detección en comparación con otros (Cattoli *et al.*, 2004). En este contexto, se describe que esta prueba es capaz de detectar hasta 5 copias de RNA por reacción, lo que demuestra su alta sensibilidad (Shu *et al.*, 2011).

Procedimientos:

- Extracción de RNA: una vez realizada la extracción, según los protocolos mencionados, se resuspendió el material genético en 50 µL de agua.
- Parámetros de control de calidad: se utilizó un control negativo propio de la extracción, también un control negativo con agua libre de RNAsas utilizada en el mix para la reacción del RT-qPCR y un control positivo el cual correspondió a un purificado de VI porcina A (H1N2).
- Mix de reacción: se preparó utilizando los primers para detectar el gen M descritos en Tabla Nro. 1, siguiendo las recomendaciones de la OMS (2013). Posteriormente, la reacción se llevó a cabo en el Termociclador de PCR en tiempo real (Stratagene Mx3000p) dispuesto en la Unidad de EpiFAVET.

Tabla Nro. 1: Primers para la detección del gen M.

<i>InfA Forward</i>	5' GACCRATCCTGTACCTCTGA C 3'
<i>InfA Reverse</i>	5' AGGGCATTYTGGACAAAKCGTCTA3'
<i>InfA Probe</i>	5' FAM-TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG-BHQ1-3'

Análisis de los resultados

Definición de caso: fueron consideradas como muestras positivas, aquellos purificados de RNA sometidos a prueba RT-qPCR, cuyo Ct (Ciclo umbral, corresponde al ciclo en que se alcance un nivel significativo de fluorescencia) haya sido inferior o igual al ciclo 38 (Shu, *et al.*, 2011).

Se calculó un valor Ct promedio mensual, para así establecer las comparaciones correspondientes.

Cálculo de prevalencia: se calculó considerando la siguiente fórmula (Salman, 2003):

$$P = \frac{MP}{TM} * 100$$

Donde:

P = prevalencia

MP = muestras positivas

TM = total de muestras

Objetivo N°2: Determinar relación entre resultados obtenidos y estacionalidad:

Para lograr este objetivo se realizó un modelo de regresión logística simple utilizando el *software* estadístico INFOSTAT®.

La regresión logística consiste en una herramienta estadística utilizada en los casos en que el resultado del estudio es de tipo dicotómico, es decir, existe presencia o ausencia de enfermedad (Dohoo *et al.*, 2003).

Para una respuesta binaria, el modelo de regresión logística simple, presenta la siguiente fórmula, la cual fue aplicada en el presente estudio (Balzarini *et al.*, 2008):

$$\text{Logit}(p_i) = \log(p_i/(1 - p_i)) = \alpha + \beta X_i$$

Donde:

p_i = probabilidad de éxito dado X_i (positividad a IA).

α = ordenada al origen (constante).

β = pendiente o coeficiente de regresión asociado a X.

X = variable explicatoria (estación).

RESULTADOS

De un total de 1.432 muestras analizadas, se obtuvo 61 muestras positivas a la prueba de RT-qPCR, estimándose un valor de Ct 32,54 como promedio total. A continuación, se adjunta Tabla Nro. 2 con resultados mensuales.

Tabla Nro. 2: Resultados de análisis mediante prueba RT-qPCR de heces de aves silvestres presentes en el HPLI, promedio, intervalo valores Ct y Desviación estándar (DS) de valores Ct de muestras positivas en los meses muestreados durante el período de octubre 2015–agosto 2016.

Mes	Total muestras	Positivos	Ct promedio muestras positivas	Intervalo valores Ct	DS
Octubre	128	0	-	-	-
Diciembre	151	12	35,49	17,95 - 37,86	5,35
Febrero	193	14	30,46	15,85 - 37,86	7,33
Marzo	192	2	28,95	23,21 - 34,7	5,75
Abril	192	28	30,82	14,61 - 37,51	6,02
Mayo	192	3	32,98	27,26 - 36,38	4,07
Julio	192	2	36,97	36,14 - 37,01	0,44
Agosto	192	0	-	-	-
TOTAL	1432	61	32,54	14,61 - 37,86	6,38

Objetivo N°1: Identificar la presencia de VIA y su prevalencia mensual en el HPLI de Concón.

Al observar los resultados del primer objetivo, se encontró una prevalencia total de un 4%, siendo los meses de diciembre, febrero y abril los que poseen los mayores niveles de prevalencia, con un 7,95%, 7,25% y 14,58% respectivamente. Los meses que registraron niveles de prevalencia no detectables fueron octubre y agosto (0%), seguidos de marzo y julio con un 1,04% y mayo, con un 1,56%. A continuación, se representan estos datos en Tabla Nro. 3.

Tabla Nro. 3: Resultados de análisis mediante prueba RT-qPCR de heces de aves silvestres presentes en el HPLI y porcentajes de prevalencia en los meses muestreados durante el período de octubre 2015–agosto 2016.

MES	Temporada	Número de muestras	Positivos	Prevalencia (%)	Intervalos de confianza 95% (%)
Octubre	PV	128	0	0	-
Diciembre	PV	151	12	7,95	(3,64 - 12,26)
Febrero	PV	193	14	7,25	(3,59 - 10,9)
Marzo	PV	192	2	1,04	(0,4 - 2,48)
Abril	OI	192	28	14,58	(9,59 – 19,57)
Mayo	OI	192	3	1,56	(0,19 - 3,31)
Julio	OI	192	2	1,04	(0,4 - 2,48)
Agosto	OI	192	0	0	-
TOTAL:	-	1432	61	4,26	-

Objetivo N°2: Determinar relación entre resultados obtenidos y estacionalidad

El modelo de regresión logística simple utilizado en el presente estudio, considera como variable dependiente aquel resultado positivo a la prueba RT-qPCR, mientras que la variable de clasificación está representada por los períodos de Primavera-Verano (PV) y Otoño-Invierno (OI), donde los meses correspondientes a la temporada de PV son octubre, diciembre, febrero y marzo, mientras que los meses de OI son abril, mayo, julio y agosto como se describe en tabla N°3.

La fuerza de asociación fue calculada como Odds Ratio (O.R.) (Tabla Nro. 4). Donde se puede observar un valor de $p = 0,9404$, señalando que la variable en estudio no posee significancia estadística, por lo que no se puede establecer una relación entre los resultados obtenidos y una marcada estacionalidad durante los meses de PV del período en estudio.

Tabla Nro. 4: Resultados de regresión logística simple para asociación entre positividad a VIA y estacionalidad PV 2015-2016 en el HPLI.

Parámetros	O.R.	I.C.I.	I.C.S.	p-valor
Constante	0,04	0,03	0,06	<0,0001
Estación PV	0,98	0,59	1,64	0,9404

No obstante, debido a las altas prevalencias registradas durante los meses de las épocas de Verano-Otoño (VO) se decidió hacer la prueba estadística para este nuevo período, considerando como parte de esta temporada los meses de febrero, marzo, abril y mayo, obteniéndose un valor de $p = 0,0004$.

Este resultado sí posee significancia estadística, por lo que el valor de O.R. demuestra que existe 3,02 veces más riesgo de encontrar positividad a VIA mediante la prueba RT-qPCR durante los meses de la temporada VO (Tabla Nro. 5).

Tabla Nro. 5: Resultados de regresión logística simple para asociación entre positividad a VIA y estacionalidad VO 2016 en el HPLI.

Parámetros	O.R.	I.C.I.	I.C.S.	p-valor
Constante	0,02	0,01	0,04	<0,0001
Estación VO	3,02	1,65	5,53	0,0004

DISCUSIÓN

Objetivo N°1: Identificar la presencia de VIA y su prevalencia mensual en el HPLI de Concón.

En Chile existe escasa información sobre la prevalencia de los VIA en comparación con lo que ocurre en los países de Norteamérica, donde los niveles de prevalencia van desde un 0,25% a un 30% en algunas especies de aves silvestres (Webster *et al.*, 1992; Olsen *et al.*, 2006).

Al establecer una comparación entre los niveles de prevalencia total con otros países de Sudamérica los valores difieren al 4,26% encontrado en este estudio a partir de 1.432 muestras. Por ejemplo, Argentina describe un 0,41% de prevalencia desde 2.895 muestras entre los años 2006-2007 (Pereda *et al.*, 2008). Perú, entre los años 2008-2009, obtuvo una prevalencia de un 0,88% de 900 muestras (Segovia *et al.*, 2013). Brasil, del 2006 al 2010,

obtuvo 0,71% para 556 muestras (de Araujo *et al.*, 2014). Y Colombia registró un 3,63% de prevalencia a partir de 2013 muestras durante los años 2010 al 2012 (Karlsson *et al.*, 2013). Otro estudio realizado en Chile, Región de Valparaíso entre septiembre 2015 y agosto 2016, encontró un valor de 0,4% de prevalencia total en el Humedal Laguna Cartagena a partir de 1.148 muestras, y un 1,04% en la Reserva Nacional Lago Peñuelas desde 1.431 muestras (González, 2017).

Parte de esta variabilidad en la prevalencia entre sitios y estaciones podría ser explicada por la presencia de aves en los humedales, ya que se ha descrito la variable especie como uno de los factores determinantes de la prevalencia de los VIA (Hurt *et al.*, 2017). Datos respecto a las especies presentes en el lugar de la toma de muestra fueron recopilados mediante el proyecto de vigilancia que engloba a esta memoria realizando constantemente censos de aves, existiendo para este estudio datos correspondientes al período de PV (octubre, diciembre, febrero y marzo) (datos no publicados). Al analizar las prevalencias de los meses de diciembre y febrero, se obtuvo valores de 7,95% y 7,25% respectivamente. Esto puede estar relacionado con la presencia de Gaviotines Elegantes (*Thalasseus elegans*) en el mes de diciembre, y Rayadores (*Rynchops niger cinerascens*) durante el mes de febrero, ambas especies pertenecientes al orden *Charadriiformes* y son migratorias visitantes estivales en Chile. Estudios previos han arrojado una mayor prevalencia de VIA en las aves de este orden en los meses de verano en el hemisferio norte, lo que podría estar asociado a altas prevalencias de VIA en *Charadriiformes* en el período estival del hemisferio sur (Webster *et al.*, 1992; Munster *et al.*, 2007; Verhagen *et al.*, 2014).

Dentro de los niveles de prevalencia más bajos se encuentran los meses de octubre y marzo (0% y 1,04%), los que difieren de estudios previos del hemisferio norte en los que se ha analizado la prevalencia de aves migratorias inter hemisféricas (Olsen *et al.*, 2006; Munster *et al.*, 2007). Las aves de mayor abundancia durante ambos meses en el humedal fueron las Gaviotas de Franklin (*Leucophaeus pipixcan*) para el mes de octubre y de Cahuil (*Chroicocephalus maculipennis*) en marzo, ambas pertenecientes al orden *Charadriiformes* (datos no publicados) y otras migratorias boreales que provienen de países donde se ha confirmado la presencia del VIA en poblaciones de estas aves silvestres (FAO, 2017). Según estudios realizados en el hemisferio norte, se esperaría una mayor prevalencia del VIA durante los meses de primavera para las aves de este orden (Webster *et al.*, 1992; Stallknecht

y Brown, 2008). Una explicación sería que se recopiló mayor cantidad de muestras pertenecientes a aves del orden *Anseriformes*, donde se describe que para el mes equivalente a octubre (abril en el hemisferio norte) se encuentran los niveles más bajos de prevalencia en patos, llegando a un 0,25% (Webster *et al.*, 1992). Sin embargo, esto no explicaría lo ocurrido durante el mes de marzo, donde se aprecia una alta prevalencia en aves del orden *Anseriformes* para esta temporada en el hemisferio norte (Olsen *et al.*, 2006; Munster *et al.*, 2007; Brown y Stallknecht, 2008). Otra variable que podría influir en la baja prevalencia durante el comienzo y el final de la temporada migratoria sería la disminución de la población de aves debido al proceso migratorio de algunas especies, las cuales durante el mes de marzo ya comienzan a dejar el sitio (Tala, 2006). Esto sugiere la necesidad de considerar más variables que podrían haber influido en los resultados del mes de marzo.

Otros estudios han establecido que los niveles de prevalencia de los VIA en aves silvestres dependen de una serie de factores, además de la especie, como las variables climáticas. De esto se podría desprender la relación entre la precipitación y la presencia de los VIA en el ambiente, ya que variaciones en las precipitaciones influirían en el movimiento de las aves y su comportamiento. En países como Australia, se ha observado que después de altas precipitaciones, el número de aves aumenta en zonas donde surgen nuevos recursos, disminuyendo en los humedales permanentes, a los que regresan una vez que los humedales temporales comienzan a secarse (Ferenczi *et al.*, 2016). Al respecto, es posible encontrar información en METEOCHILE, (2018), donde la estación más cercana al HPLI es la ubicada en Rodelillo. Para el período en estudio se registró la información disponible en Tabla Nro. 6. En estos datos se destacan las lluvias de los meses de octubre, abril y julio 2016, ya que, en estos meses se registró alrededor de 100 mm de precipitación, pero con niveles de prevalencia de 0%, 14,58% y 1,04% respectivamente, haciendo presumir que los niveles de prevalencia no estarían explicados por la precipitación en este caso.

Otros autores consideran que las bajas temperaturas y la HR influyen considerablemente en la preservación y diseminación del virus, definiendo que el VIA es viable por un período diez veces mayor a 17°C que a 28°C, y que a bajas temperaturas y alta humedad relativa (aproximadamente 7°C y 88% HR) el virus persiste alrededor de dos semanas en heces de gallinas (Herrick *et al.*, 2013). Interesantemente, la temperatura y HR durante los meses de octubre y agosto en nuestra área de estudio registraron las temperaturas medias más bajas

(11,1°C y 10,3°C respectivamente), como también los valores más altos de HR junto a los meses de marzo y mayo, oscilando entre un 86,5% - 91% de HR. Por lo tanto, se torna necesario llevar a cabo más estudios que permitan dilucidar la significancia de estos datos en los resultados obtenidos.

Tabla Nro. 6: Valores de temperaturas medias, precipitación total diaria y mensual y HR para los días muestreados durante el período de octubre 2015–agosto 2016, estación Rodelillo.

Mes	Fecha	Prevalencia (%)	T° Media Diaria (°C)	Precip. Total Diaria (mm)	Precip. Total Mensual (mm)	HR Media Diaria (% HR)
Octubre	20-oct-15	0	11.1	0	100.9	86.5
Diciembre	15-dic-15	7,95	16.5	0	0.1	71.5
Febrero	17-feb-16	7,25	15.6	0	0	79.5
Marzo	17-mar-16	1,04	15.0	0	2.7	87.5
Abril	27-abr-16	14,58	14.2	0	123.4	59.2
Mayo	27-may-16	1,56	12.1	0.1	48.8	91.0
Julio	23-jul-16	1,04	12.6	1.1	125.8	83.2
Agosto	26-ago-16	0	10.3	0	0.2	87.2

METEOCHILE, 2018.

Respecto a los valores Ct de las muestras positivas, se obtuvo un promedio total de 32,54. Entre estos valores se destaca el mes de marzo con un Ct promedio de 28,95, lo que sugiere una mayor cantidad de RNA viral en las muestras positivas a la prueba RT-qPCR en comparación a los valores promedios calculados en los otros meses. En América del Norte, se describe que, en los meses de verano tardío y otoño temprano, existe una gran concentración de aves juveniles de la temporada que podrían influir en la presencia de los VIA en determinada área (Stallknecht and Brown, 2008). Esta mayor susceptibilidad de individuos juveniles debido a la falta de anticuerpos específicos contra VIA ha sido detectada también en pavos y avestruces frente a VIA de baja patogenicidad (Krauss *et al.*, 2004; Pantin-Jackwood, *et al.*, 2007). De esta manera, el bajo promedio de Ct durante el mes de marzo podría verse explicado en un aumento en juveniles sin exposición previa a VIA.

Objetivo N°2: Determinar relación entre resultados obtenidos y estacionalidad

Este estudio propuso como hipótesis encontrar mayores niveles de prevalencia durante los meses de la temporada PV debido a la presencia de aves migratorias en el HPLI. Al respecto, no se encontró asociación, por lo que se tomó la decisión de analizar otras temporadas, resultando la temporada VO como una variable asociada a los niveles de prevalencia de los VIA en el HPLI.

Estudios señalan un aumento de prevalencia durante los meses de verano tardío-otoño temprano mayoritariamente en las aves del orden *Anseriformes* (Webster *et al.*, 1992; Olsen *et al.*, 2006; Munster *et al.*, 2007; Brown and Stallknecht, 2008). Sin embargo, en los meses correspondientes al período, en el HPLI hay una mayor presencia a aves pertenecientes al orden *Charadriiformes* (datos no publicados). Estos antecedentes harían presumir que el aumento de la prevalencia durante la temporada VO no se debería a la presencia de aves *Anseriformes*, sino más bien a una mayor tasa de infección en *Charadriiformes*. aunque no se puede descartar que los pocos ejemplares de *Anseriformes* presentes en el humedal podrían estar contribuyendo a un aumento tardío de la prevalencia en *Charadriiformes*. Se debiera considerar por lo tanto la existencia de algún tipo de sesgo al momento de la toma de muestra, que podría haber estado dirigida a los pocos ejemplares de *Anseriformes* presentes.

El incremento anual de la abundancia de aves juveniles también figura como un factor influyente en la estacionalidad de los niveles de prevalencia de los VIA, ya que poseen características inmunológicas que los hacen más susceptibles a ser infectados por el virus siendo importantes amplificadores de este. Asimismo, la congregación estacional de las aves en momentos previos a la migración (*marshalling*) produce un aumento de la tasa de contacto, favoreciendo la diseminación del virus (Krauss *et al.*, 2004; Brown and Stallknecht, 2008).

Al considerar las variables de tipo climáticas descritas en Tabla Nro. 6, las temperaturas medias ambientales registradas por la estación meteorológica más cercana al HPLI, oscilaron entre los 10,3°C y 16,5°C durante los días de muestreo (METEOCHILE, 2018), pero se desconocen los datos correspondientes a los cuerpos de agua que conforman dicho humedal, variables que podrían influir en la persistencia del virus en el ambiente durante la temporada VO. También se ha determinado que fenómenos de tipo ambiental como “El Niño Oscilación

Sur” (ENOS) afectan la dinámica de las prevalencias de VIA, ya que altera los parámetros climáticos, generando cambios en el comportamiento y los movimientos de las aves, como el retraso en la llegada de las aves migratorias (Ferenczi *et al.*, 2016). Respecto a este fenómeno, se describe que genera alteraciones atmosféricas y oceánicas que repercuten en los distintos ecosistemas; es así como se produce un aumento de la temperatura superficial del mar y una baja disponibilidad de nutrientes en aguas costeras, lo que conlleva a el traslado de los peces en búsqueda de alimento y el consecuente movimiento de las aves que se alimenten de estos (SHOA, 2017). Por lo que se considera que, a pesar de haber demostrado mediante este estudio una relación entre los niveles de prevalencia del VIA en las aves silvestres del HPLI y una estacionalidad en la temporada VO 2015-2016, no podría concluirse que esta estacionalidad prevalece a lo largo de los años, ya que está sujeta a una serie de variables que no fueron consideradas en este estudio y en las que aún se debe indagar e investigar para llegar a conclusiones más certeras.

CONCLUSIÓN

En esta memoria, se pudo comprobar que durante los meses de octubre 2015 a agosto 2016 sí existió presencia de VIA en las aves silvestres del HPLI de la localidad de Concón, estando presente en 75% de los meses estudiados.

También, acorde a la bibliografía revisada, se propuso una asociación entre la positividad a VIA y una estacionalidad en la temporada PV, sin embargo, los resultados dieron lugar a un nuevo planteamiento, el de la existencia de un riesgo al menos 3 veces mayor de encontrar positividad a VIA mediante la prueba RT-qPCR durante la temporada de VO en las aves silvestres del HPLI.

Todo esto generó un nuevo escenario, en el cual se demostró la existencia de una gran brecha de información en torno al estudio de las dinámicas de los VIA en la región de Sudamérica en comparación con lo ocurrido en países del Hemisferio norte. Y también se estableció la importancia de considerar múltiples variables que podrían estar influyendo sobre los resultados obtenidos, entre las cuales destacan la especie de ave a la que pertenece la muestra, la temperatura y salinidad del agua en la cual se encuentran las aves y otras variables ambientales como los niveles de precipitación y humedad relativa al momento de la toma de muestra, o fenómenos como ENOS.

De esta manera, el presente estudio es una “fotografía” de lo ocurrido en torno a los VIA en las aves silvestres del HPLI en el período de octubre 2015-agosto 2016, pero al no involucrar una serie de variables se imposibilita la extrapolación de los datos obtenidos hacia los años siguientes.

BIBLIOGRAFÍA

ACUÑA, G. 2004. Influenza: Historia y amenazas. *Rev. Chil. Infect.* 21 (2): 162-164.

AFANADOR-VILLAMIZAR A.; GOMEZ-ROMERO, C.; DIAZ, A.; RUIZ-SAENZ, J. 2017. Avian influenza in Latin America: A systematic review of serological and molecular studies from 2000-2015. *PLoS ONE* 12 (6): e0179573.

BALZARINI, M. G.; GONZALEZ, L.; TABLADA, M.; CASANOVES, F.; DI RIENZO, J. A.; ROBLEDO, C. W. 2008. *InfoStat, Software Estadístico, Manual del usuario.* Editorial Brujas. Córdoba, Argentina.

BELDOMENICO, P.; UHART, M. 2008. Ecoepidemiología de los virus de Influenza Aviar. *Rev. FAVET – Cie. Vet.* (7): 23-40.

BRAVO-VASQUEZ, N.; DI PILLO, F.; LAZO, A.; JIMÉNEZ-BLUHM, P.; SCHULTZ-CHERRY, S.; HAMILTON-WEST, C. 2016. Presence of influenza viruses in backyard poultry and swine in El Yali wetland, Chile. *Prev. Vet. Med.* 4114: 5p.

BROWN, J.; SWAYNE, E.; COOPER, R.; BURNS, R.; STALLKNECHT, D. 2007. Persistence of H5 and H7 Avian Influenza Viruses in Water. *American Association of Avian Pathologists. Av. Dis.,* 51(s1):285-289.

BROWN, J.; STALLKNECHT, D. 2008. Wild Bird Surveillance for the Avian Influenza Virus. In: Spackman E. (eds) *Avian Influenza Virus. Met. in Mol. Bio.* vol 436. Humana Press.

CATTOLI, G.; DRAGO, A.; MANIERO, S.; TOFFAN, A.; BERTOLI, E.; FASSINA, S. 2004. Comparison of three rapid detection systems for type A influenza virus on tracheal swabs of experimentally and naturally infected birds. *Av. Path.* 33:432 – 437.

CDC. 2014a. Contagio de los virus de influenza de animales a personas. [en línea] <https://espanol.cdc.gov/enes/flu/about/viruses/transmission.htm?mobile=nocontent> [consulta: 06-04-2016]

CDC. 2014b. Avian Influenza in Birds. [en línea] <<http://www.cdc.gov/flu/avianflu/avian-in-birds.htm>> [consulta: 14-04-2016]

CFSPH. 2010. Influenza aviar de alta patogenicidad. [en línea] <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/influenza_aviar_de_alta_patogenicidad.pdf> [consulta: 05-04-2016]

DE ARAUJO, J.; DE AZEVEDO, S.; GAIDET, N.; HURTADO, R.; WALKER, D.; THOMAZELLI, L.; OMETTO, T.; SEIXAS, M.; RODRIGUES, R.; GALINDO, D.; DA SILVA, A.; RODRIGUES, A.; BOMFIM, L.; MOTA, M.; LARRAZÁBAL, M.; BRANCO, J.; SERAFINI, P.; NETO, I.; FRANKS, J.; WEBBY, R.; WEBSTER, R.; DURIGON, E. 2014. Avian Influenza Virus (H11N9) in Migratory Shorebirds Wintering in the Amazon Region, Brazil. Plos One. Vol 9 (10): e110141.

DOHOO, I.; MARTIN, W.; STRYHN, H. 2003. Veterinary Epidemiologic Research. AVC Inc. Charlottetown Prince Edward Island Canada. 727 p.

FAO. 2017. EMPRES-i Global Animal Disease Information System. [en línea] <<http://empres-i.fao.org/eipws3g/>> [consulta: 10-08-2017]

FERENCZI, M.; BECKMANN, C.; WARNER, S.; LOYN, R.; O'RILEY, K.; WANG, X.; KLAASSEN, M. 2016. Avian influenza infection dynamics under variable climatic conditions, viral prevalence is rainfall driven in waterfowl from temperate, south-east Australia. Vet. Res. 47:23.

FRANKLIN, A.; VANDALEN, K.; SHRINER, S. 2009. The role of environmental sampling in the surveillance of avian influenza virus in wild Birds. The 7th International Avian Influenza Conference: avian influenza in poultry and wild birds; 5–8 April, 2009, Athens, Georgia.

GONZÁLEZ, S. 2017. Determinación de la relación entre prevalencia de virus de influenza aviar y estacionalidad de las comunidades de aves silvestres en los sectores humedal laguna Cartagena y reserva nacional Lago Peñuelas. Tesis para optar al Título de Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. Cs. Veterinarias y Pecuarias. 61p.

HERRICK, K.; HUETTMANN, F.; LINDGREN, M. 2013. A global model of avian influenza prediction in wild birds: the importance of northern regions. *Vet. Res.* 44:42.

HURT, A.; FOUCHIER, R.; VIJAYKRISHNA, D. 2017. Ecology and Evolution of Avian Influenza Viruses. **In:** Genetics and Evolution of Infectious Diseases. Second Edition. Amsterdam, Holanda. pp 621-640.

ILIZÁSTIGUIR, F.; RODRÍGUEZ, L. 2010. El método clínico. *Medisur* 8 (5): 2-11.

JARAMILLO, A. 2005. Aves de Chile. 2ª ed. Lynx Edicions. Santiago, Chile. 240p.

KARLSSON, E.; CIUODERIS, K.; FREIDEN, P.; SEUFZER, B.; JONES, J.; JOHNSON, J.; PARRA, R.; GONGORA, A.; CARDENAS, D.; BARAJAS, D.; OSORIO, J.; SCHULTZ-CHERRY, S. 2013. Prevalence and characterization of influenza viruses in diverse species in Los Llanos, Colombia. *Eme. Micr. and Inf.* e20.

KRAUSS, S.; WALKER, D.; PRYOR, P.; NILES, L.; CHENGHONG, LI.; HINSHAW, V.; WEBSTER, R. 2004. Influenza A Viruses of Migrating Wild Aquatic Birds in North America. *Vec.-Bor. and Zoo. Dis.* Vol 4: p177-189.

MATHIEU, C.; MORENO, V.; RETAMAL, P.; GONZALEZ, A.; RIVERA, A.; FULLER, J.; JARA, C.; LECOCQ, C.; ROJAS, M.; GARCÍA, A.; VÁSQUEZ, M.; AGREDO, M.; GUTIÉRREZ, C.; ESCOBAR, H.; FASCE, R.; MORA, J.; GARCÍA, J.; FERNÁNDEZ, J.; TERNICIER, C.; AVALOS, P. 2010. Pandemic (H1N1) 2009 in Breeding Turkeys, Valparaiso, Chile. *Eme. Inf. Dis.* 16 (4): 709-711.

MATHIEU, C.; MORENO, V.; PEDERSEN, J.; JERIA, J.; AGREDO, M.; GUTIÉRREZ, C.; GARCÍA, A.; VÁSQUEZ, M.; AVALOS, P.; RETAMAL, R. 2015. Avian Influenza in wild birds from Chile, 2007-2009. *Vir. Res.* 199 (2015) 42-45.

METEOCHILE. 2018. Climatología. [en línea] <<http://164.77.222.61/climatologia/>> [consulta: 26-01-2018]

MHNV. 2015. Guía avistamiento de aves, Parque Ecológico La Isla de Concón. [en línea] <https://issuu.com/mnhn_cl/docs/gu_a_avistamiento_de_aves> [consulta: 10-04-2017]

MUNSTER, V.; BAAS, C.; LEXMOND, P.; WALDENSTRÖM, J.; WALLENSTEN, A.; FRANSSON, T.; RIMMELZWAAN, G.; BEYER, W.; SCHUTTEN, M.; OLSEN, B.; OSTERHAUS, A.; FOUCHIER, R. 2007. Spatial, Temporal, and Species Variation in Prevalence of Influenza A Viruses in Wild Migratory Birds. PLoS Path. Vol 3: p630-638.

OIE. 2016. ¿Qué es la influenza aviar? [Fichas de información general sobre enfermedades animales] Paris, Francia. OIE. 6 p

OLSEN, B.; MUNSTER, VJ.; WALLENSTEN, A.; WALDENSTRÖM, J.; OSTERHAUS AD.; FOUCHIER, RA. 2006. Global Patterns of Influenza A Virus in Wild Birds. Science. Vol 312.

OMS. 2013. Real-time RT-PCR Protocol for the Detection of Avian Influenza A (H7N9) Virus. [en línea] http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/cnic_realtime_rt_pcr_protocol_a_h7n9.pdf ≥ [consulta: 04-05-2016].

OMS. 2016. Virus de la gripe aviar y otros virus de la gripe de origen zoonótico. [en línea] http://www.who.int/mediacentre/factsheets/avian_influenza/es/ [consulta: 04-08-2017]

OMS. 2017. Influenza Update N°297. [en línea] http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/2017_09_04_update_GIP_surveillance/en/ [consulta: 23-09-2017]

PAN, M.; GAO, R.; LV, Q.; HUANG, S.; ZHOU, Z.; YANG, L.; LI, X.; ZHAO, X.; ZOU, X.; TONG, W.; MAO, S.; ZOU, S.; BO, H.; ZHU, X.; LIU, L.; YUAN, H.;ZHANG, M.; WANG, D.; LI, Z.; ZHAO, W.; MA, M.; LI, Y.; LI, T.; YANG, H.; XU, J.; ZHOU, L.; ZHOU, X.; TANG, W.; SONG, Y.; CHEN, T.; BAI, T.; ZHOU, J.; WANG, D.; WU, G.; LI, D.; FENG, Z.; GAO, G.; WANG, Y.; HE, S.; SHU, Y. 2016. Human infection whit a novel, highly pathogenic avian influenza A (H5N6) virus: Virological and clinical findings. J. Infect. 72 (1): 52-59.

PANTIN-JACKWOOD, M.; SUAREZ, D.; SPACKMAN, E.; SWAYNE, D. 2007. Age at infection affects the pathogenicity of Asian highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses in ducks. Virus Research. 130: 151-161.

PEREDA, A.; UHART, M.; PEREZ, A.; ZACCAGNINI, M.; LA SALA, L.; DECARRE, J.; GOIJMAN, A.; SOLARI, L.; SUAREZ, R.; CRAIG, M.; VAGNOZZI, A.; RIMONDI, A.; KÖNIG, G.; TERRERA, M.; KALOGHLIAN, A.; SONG, H.; SORRELL, E.; PEREZ, D. 2008. Avian Influenza Virus Isolated in Wild Waterfowl in Argentina: Evidence of a potentially unique phylogenetic lineage in South America. *Virology*; 378 (2): 363-370.

RABAGLIATI, R.; SIRI, L.; PÉREZ, C.; LABARCA, J.; FERRÉS, G. 2011. Influenza pandémica A (H1N1) 2009: epidemiología, características clínicas y diferencias con influenza estacional en Chile. *Rev. Chil. Infect.* 2011; 28 (6): 546-553.

RASEK, A.; RIVEROS, G. 2006. Comunidad invernal de aves en la desembocadura del río Aconcagua (V Región, Chile). *Anales del Museo de Historia Natural de Valparaíso* 25: 57-64.

ROJAS, H.; MOREIRA, R. 2006. Influenza Aviar en Chile 2002: una Sinopsis. [Boletín Veterinario Oficial]. Santiago, Chile. Servicio Agrícola y Ganadero. 21 p.

SAG. 2012. Censos Nacionales de Aves Acuáticas. Informe N°3 Final. CECPAN. Santiago, Chile. 149p.

SAG. 2014. Informe sanidad animal año 2014. Unidad de Vigilancia y Control de Enfermedades, Subdepartamento de Sanidad Animal. Santiago, Chile. 94p.

SAG. 2017. SAG detecta influenza aviar en pavos de engorda en la Región de Valparaíso. [en línea] <<http://www.sag.cl/noticias/sag-detecta-influenza-aviar-en-pavos-de-engorda-en-la-region-de-valparaiso>> [consulta: 10-08-2017]

SALMAN, M. 2003. Animal disease surveillance and survey systems, methods and applications. Iowa State Press. Iowa, Estados Unidos. 222 p.

SEGOVIA, K.; ICOCHEA, E.; GONZÁLEZ, R.; GHERSI, B.; GONZÁLEZ, A. 2013. Presencia del virus de influenza aviar en aves silvestres de los humedales de puerto viejo, Lima. *Rev Inv Vet Perú*; 24 (1): 98-103.

SHOA. 2017. ENOS – Fenómeno de “El Niño”. [en línea] <<http://www.shoa.cl/nuestros-servicios/mareas/54-servicios/753-enos-fenomeno-de-el-nino>> [consulta: 30-12-2017]

SHU, B.; WU, K.; EMERY, S.; VILLANUEVA, J.; JOHNSON, R.; GUTHRIE, E.; BERMAN, L.; WARNES, C.; BARNES, N.; KLIMOV, A.; LINDSTROM, S. 2011. Design and Performance of the CDC Real-Time Reverse Transcriptase PCR Swine Flu Panel for Detection of 2009 A (H1N1) Pandemic Influenza Virus. *Journal of Clinical Microbiology*. 2614-2619p.

SPACKMAN, E.; McCracken, K.; WINKER, K.; SWAYNE, D. 2006. H7N3 Avian Influenza Virus Found in a South American Wild Duck Is Related to the Chilean 2002 Poultry Outbreak, Contains Genes from Equine and North American Wild Bird Lineages, and Is Adapted to Domestic Turkeys. *Journal of Virology*. p 7760-7764.

SPACKMAN, E. 2008. A brief introduction to the influenza virus. *Methods Mol Biol*. 436:1-6.

SPACKMAN, E.; SUAREZ, D. 2008. Avian influenza virus RNA extraction from tissue and swab material. *Methods Mol Biol*. 436: 13-18.

SPACKMAN, E.; LEE, S. 2014. Avian influenza virus RNA extraction. *Methods Mol Biol*. 1161: 93-104.

STALLKNECHT, D.; BROWN, J. 2008. Ecology of Avian Influenza in Wild Birds. **In:** Avian Influenza. Iowa State University Press. Arnes, AI, Estados Unidos. pp. 43-58.

TALA, C. 2006. Qué hacen aquí esas gaviotas... qué hacen aquí, tan lejos de su lugar natal. *Boletín Veterinario Oficial. SAG-División de Protección de los Recursos Naturales Renovables. Santiago, Chile*. 24p.

VALLADARES, J. 2015. Detección del virus de influenza aviar en patos domésticos de crianza familiar en las provincias de Huaral y Huaura. Tesis para optar el Título Profesional de Médico Veterinario. Lima, Perú. U. Nacional Mayor de San Marcos, Fac. de Medicina Veterinaria. 65 p.

VERHAGEN, J.; MAJOOR, F.; LEXMOND, P.; VUONG, O.; KASEMIR, G.; LUTTEROP, D.; OSTERHAUS, A.; FOUCHIER, R.; KUIKEN, T. 2014. Epidemiology of Influenza A Virus among Blackheaded Gulls, the Netherlands, 2006–2010. *Emerging Infectious Diseases*. Vol 20: p138-141.

VICTORIANO, P.; GONZÁLEZ, A.; SCHLATTER, R. 2006. Estado de conocimiento de las aves de aguas continentales de Chile. *Gayana* 70(1): 140-162.

WEBSTER, R.; BEAN, W.; GORMAN, O.; CHAMBERS, T.; KAWAOKA, Y. 1992. Evolution and Ecology of Influenza A Viruses. *Microbiological reviews*. p. 152-179.

WHITE, S.; MA, W.; McDANIEL, C.; GRAY, G.; LEDNICKY, J. Serologic evidence of exposure to influenza D virus among persons with occupational contact with cattle. *Jour. of Clin. Vir.* 81:31-33.