



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

**DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE PARAMIXOVIRUS
AVIARES EN PINGÜINO PAPÚA (*Pygoscelis papua*) DEL
TERRITORIO ANTÁRTICO CHILENO**

JOSÉ AGUSTÍN DEL RÍO MURTAGH

Tesis para optar al Título
Profesional de Médico
Veterinario y al
Grado de Magíster en
Ciencias Animales y
Veterinarias

PROFESORES GUÍAS: VÍCTOR NEIRA RAMÍREZ, CRISTÓBAL BRICEÑO
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

Santiago, Chile
2017

FUENTE DE FINANCIAMIENTO Y DEPARTAMENTO

Esta tesis fue desarrollada en el Departamento de Medicina Preventiva y ha sido financiada por INACH proyecto 12-13, proyectos de investigación patrocinados por la dirección de investigación códigos 121017019102080, 121017019102100 y 121017019102121. Este trabajo fue posible de realizar gracias al apoyo del Instituto de Salud Pública (ISP).

BIOGRAFÍA

Mi nombre es José Agustín del Río Murtagh, nací el 18 de octubre del año 1988 en la ciudad de Santiago, Chile. Provengo de una familia de 5 integrantes, constituida por mis dos padres, dos hermanas y yo. Desde temprana edad estuve ligado al campo, específicamente al “Fundo la Posada”, ubicado en el sector rural de la ciudad de Cauquenes, Región del Maule. Hasta 4° básico, cursé mi enseñanza en la escuela Hugo Errázuriz de Viña del Mar, para posteriormente y por motivos familiares, trasladamos a vivir a la localidad de Cauquenes. En esta ciudad, me integré al Liceo Inmaculada Concepción, institución en la que completé mi aprendizaje de enseñanza básica y media. El año 2008 postulé e ingresé a la carrera de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, principalmente guiado por el enfoque y prestigio que tienen sus profesionales en el desarrollo del país. Egresé el año 2013 e inmediatamente decidí comenzar el magíster de continuidad de Ciencias Animales y Veterinarias de FAVET. Mi mayor aspiración profesional es dedicarme a lo que me gusta, la patología.

“Para mi familia y amigos, pero especialmente dedicado a los dos amores de mi vida, Angela y Amaro”

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Víctor Neira por invitarme a participar en esta investigación y por apoyarme en todo el proceso de tesis. A mis correctores de proyecto: Dr. José Pizarro, Dr. Patricio Retamal y Dr. Cristóbal Briceño; por todas sus sugerencias y contribuciones en mi trabajo. Al Dr. Daniel González, por permitirnos trabajar con las muestras que utilizamos y por su excelente trabajo en la recolección de estas, lo que fue crucial en la obtención de nuestros resultados. También, me gustaría agradecer especialmente al Dr. Federico Cifuentes, por su voluntad, disposición y enseñanzas en mi formación como Médico Veterinario.

A mi familia, por su apoyo incondicional y por mi formación como persona. A mis amigos: Diego, Raúl, David, Maite, Fernando, Carolina y Cristian; por apoyarnos en el cruce de nuestras vidas y reír en el proceso.

Para Angela, porque apareciste inesperadamente y desde ese momento iluminaste mi vida con tu maravillosa esencia, daría eternamente otro salto de fe contigo; te amo flaca linda. A la persona más fuerte que conozco, mi poroto chico, porque desde su imprevista llegada ha tenido obstáculos y los ha superado todos con su inmensa garra y alegría, gracias por llenar todos los días nuestros corazones de amor. Ustedes dos son el ejemplo perfecto de lo impredecible y hermosa que es la vida; los amo.

A Elcira Valenzuela, porque desempeña una función muchas veces invisible, pero que es fundamental para todo el trabajo de laboratorio y porque sin su ayuda nada de esto sería posible. Al Dr. Nicolás Bravo, Ana Jedlicki y Rodrigo Tapia por su inmensa ayuda, consejos y apoyo; muchas gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. Resumen	1
2. <i>Summary</i>	2
3. Introducción	3
4. Revisión Bibliográfica	4
4.1. Antecedentes de la Especie	4
4.2. Agentes Infecciosos en la Avifauna Antártica	6
4.3. Paramixovirus Aviaries (APMV)	8
4.3.1. Características Virales	9
4.3.2. Diagnóstico de Paramixovirus Aviaries (APMV)	11
4.4. Enfermedad de Newcastle	12
5. Hipótesis	14
6. Objetivo General	14
7. Objetivos Específicos	14
8. Material y Métodos	15
8.1. Colección de Muestras	15
8.1.1. Pruebas Diagnósticas	17
8.1.2. Procesamiento de Muestras	17
8.2. Aislamiento Viral	17
8.2.1. Inoculación de Huevos Embrionados	17
8.2.2. Recolección de Líquido Alantoideo	19
8.2.3. Prueba de Hemoaglutinación (HA)	19
8.3. Identificación Molecular de Paramixovirus Aviaries (APMV)	22
8.3.1. Extracción de Material Genético	22
8.3.2. Diagnóstico Molecular de Paramixovirus aviaries	22
8.3.3. Secuenciación y Análisis Filogenético	23
8.4. Bioseguridad y Bioética	24
9. Resultados	26
9.1. Aislamiento Viral	26
9.2. Reacción de la Polimerasa en Cadena con Transcriptasa Inversa (RT-PCR)	27
9.3. Secuenciación y BLAST	28
9.4. Análisis Filogenético	28
9.5. Comparaciones Nucleotídicas y Aminoacídicas	31
10. Discusión	33
11. Conclusión	39
12. Bibliografía	40
13. Anexos	49

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

IMÁGENES

Imagen 1: Fotografía de Pingüino papúa (<i>Pygoscelis papua</i>)	4
Imagen 2: Estructura de los paramixovirus aviáres	10
Imagen 3: Mapa Península Antártica, Ubicación de los lugares de muestreo	16
Imagen 4: Prueba de Hemoaglutinación	21
Imagen 5: Resultado del RT-PCR para la familia <i>Paramixoviridae</i>	27
Imagen 6: Secuencias génicas confirmadas de los APMV	28
Imagen 7: Árbol filogenético de los APMV detectados en <i>Pygoscelis papua</i>	30

CUADROS

Cuadro 1: Aislamientos positivos a hemoaglutinación	26
Cuadro 2: Diferencias nucleotídicas y aminoacídicas	32

1. RESUMEN

La Antártida siempre ha fascinado a la comunidad científica, debido a que representa a uno de los últimos lugares vírgenes de nuestro planeta. Sus ecosistemas se encuentran aislados geográfica y climáticamente del resto de los continentes, sin embargo, su fauna no se halla exenta de enfermedades y agentes infecciosos. El objetivo de esta investigación consistió en aislar e identificar paramixovirus aviare (APMV) en ejemplares de pingüinos de papúa (*Pygoscelis papua*), provenientes del territorio Antártico.

El estudio se efectuó en la Península Antártica Chilena, durante los años 2014 - 2015 y consideró la recolección de 345 muestras cloacales/ambientales desde colonias reproductivas localizadas en Isla Kopaitic (63°19' S, 57°55'W), Base Presidente Gabriel González Videla (64°49'S, 62°51'W), Dorian Bay (64°49'S, 63°30'W), Base Brown (64°53'S, 62°52'W) y Pleneau Island (65°06'S, 64°04'W). El análisis y procesamiento de muestras se desarrolló en el Laboratorio de Virología Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile. La metodología incluyó aislamiento viral, pruebas de hemoaglutinación, RT-PCR para la detección de miembros de la familia *Paramyxoviridae* y análisis filogenéticos de los resultados obtenidos. De la totalidad de muestras, 13 evidenciaron reacción hemoaglutinante, de estas, cinco resultaron positivas al RT-PCR de APMV y cuatro lograron ser secuenciadas para el análisis filogenético. La filogenia agrupa a los virus aislados dentro de los paramixovirus aviare, cercanamente emparentado con APMV-12 y APMV-13, pero sugiere la segregación en dos nuevas especies virales.

Se logró aislar e identificar paramixovirus aviare en colonias de pingüino papúa del territorio antártico, con evidencia que sugiere la existencia de nuevas especies de estos agentes virales. Esto constituye el primer hallazgo de este grupo de agentes virales en *Pygoscelis papua* y refuerzan la necesidad de continuar desarrollando estudios en la avifauna antártica.

Palabras claves: Paramixovirus, Pingüino papúa, Antártica.

2. SUMMARY

The scientific community has always been fascinated by the pristine nature of the antarctic continent. The South Pole ecosystems are geographically and climatically isolated from other continents, however, the fauna that lives in this place, is not free of diseases and infectious agents. The objective of this investigation was to isolate and to identify avian paramyxoviruses in Gentoo penguins (*Pygoscelis papua*) from the Antarctic territory.

The sample collection of this study was performed in the Chilean Antarctic during 2014 – 2015, 345 cloacal / environmental samples were collected from reproductive colonies at isla Kopaitic (63 ° 19 'S, 57 ° 55'W), Base President Gabriel Gonzalez Videla (64 ° 49'S, 62 ° 51'W), Dorian Bay (64 ° 49'S, 63 ° 30'W), Brown Base (64 ° 53'S, 62 ° 52'W) and Pleneau Island (65°06'S, 64°04'W). The analysis and processing of samples was done in the Animal Virology Lab, College of Veterinary and Livestock Sciences, University of Chile. Viral isolation, haemagglutination tests, RT-PCR for the Paramyxoviridae detection and phylogenetic analyzes were conducted. Thirteen samples were isolated in embryonated chicken eggs, five of these samples were positive to RT-PCR. Three out five were sequenced for phylogenetic analysis. Phylogeny clasiffies viruses isolated as avian paramyxoviruses (APMV), closely related to APMV-12 and APMV-13, but not identical, which suggest that this new isolates could be new viral species.

It was possible to isolate and to identify avian paramyxoviruses in Antarctic penguin colonies. Evidence suggests that a new species of these viral agents was discovered. These results constitute the first record of isolation of APMV in *P. papua* and reinforce the need to continue studies in the Antarctic avifauna.

Key Words: Paramyxovirus, Gentoo Penguin, Antarctic.

3. INTRODUCCIÓN

En el transcurso de la historia, el hombre siempre ha deseado explorar y descubrir territorios desconocidos e inhóspitos, con el claro objetivo de intentar comprender la complejidad del universo que nos rodea. En este contexto y desde hace algunas décadas, la curiosidad científica ha puesto su atención sobre el continente Antártico, en lo que respecta principalmente a su fauna y a las consecuencias tangibles del cambio climático. Sin embargo, también existe un creciente interés en profundizar conocimientos respecto a la presencia de patógenos, especialmente aquellos con el potencial de generar enfermedades de alto impacto sanitario dentro de las poblaciones animales.

La enfermedad de Newcastle, descrita por primera vez durante 1926 en Indonesia e Inglaterra, es causada por el paramixovirus aviar tipo 1 (APMV-1), un virus considerado de distribución global, ya que se ha identificado en más de 200 especies de aves silvestres alrededor del mundo. Este virus pertenece a una familia compuesta por doce serotipos distintos de paramixovirus aviares, de los cuales cinco han demostrado provocar enfermedad en aves domésticas. La información relacionada a la presencia de estos agentes en la avifauna del territorio antártico es escasa y centrada casi exclusivamente en hallazgos serológicos. Por esta razón, es fundamental profundizar en el rol que cumplen estas aves silvestres para la mantención y diseminación de estos virus en el ecosistema que habitan.

El objetivo de esta investigación, consiste en la búsqueda de paramixovirus aviares, mediante técnicas de aislamiento e identificación en poblaciones de pingüino papúa (*Pygoscelis papua*) del territorio Antártico chileno. Con esto, se pretende comprender el origen de dichos virus en relación a las cepas circulantes en el resto del mundo, así como también identificar potenciales cepas que impliquen un peligro a la conservación de las aves que habitan este ecosistema.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1 Antecedentes de la Especie

El pingüino papúa (*Pygoscelis papua*) es un ave marina no voladora, que pertenece al Orden Sphenisciformes y a la Familia Spheniscidae. La especie fue descrita en 1781, por Johann Forster. Se reconocen dos subespecies para esta ave, *Pygoscelis papua ellsworthi* y *Pygoscelis papua papua* (Stonehouse, 1970). El primero es pequeño y está distribuido en la península antártica, mientras que el segundo posee un mayor tamaño corporal y anida en las distintas islas sub-antárticas (Bost y Jouventin, 1990).

Morfológicamente, su tamaño corporal fluctúa entre 51 y 90 cm (IUCN, 2015), mientras que su peso promedio en adultos oscila entre 5 y 8 kilogramos (Lynch, 2013). Externamente, la superficie dorsal de sus alas y espalda está cubierta de plumaje negro, mientras que la zona ventral de su cuerpo posee un plumaje blanco (Lynch, 2013). Alrededor de sus ojos ostenta un parche blanco que se extiende hasta su coronilla (ver Imagen 1) y su mandíbula baja tiene una coloración que varía de rojo a naranja, ambos rasgos son considerados como distintivos de la especie (Davis y Renner, 2003).



Imagen 1: Fotografía de Pingüino papúa (*Pygoscelis papua*). Fuente: WWF (World Wildlife Fund), 2016

En el transcurso de las últimas décadas, el tamaño poblacional de esta especie se ha incrementado (Lynch *et al.*, 2012), puesto que hace 20 años se consideró la existencia de 314.000 parejas reproductivas (Woehler, 1993 citado por García-Borboroglu y Boersma, 2013) y recientemente esta estimación aumentó a 387.000 (Lynch, 2013). El establecimiento de cardúmenes de krill (*Euphausia superba*) y el acceso a sitios de nidificación, ocasionados por la elevación de la temperatura en la península antártica estarían asociados a este cambio poblacional (Peña *et al.*, 2014).

A diferencia del resto de los pingüinos de su familia, el pingüino papúa es un depredador costero con una elevada capacidad de adaptación a las condiciones locales de disponibilidad de recursos alimenticios (Robinson y Hindell, 1996). Por esta razón, exhibe plasticidad alimentaria y se identifica como una especie oportunista (Lescroël *et al.*, 2004). En la Antártica, su dieta estaría conformada principalmente por krill (*Euphausia superba*) (Croxall y Prince, 1980) y en las islas sub-antárticas estaría compuesta fundamentalmente por peces (Adams y Klages, 1989; Robinson y Hindell, 1996).

En lo que respecta a su proceso reproductivo, la anidación se lleva a cabo en islas sub-antárticas y en la península antártica (Bost y Jouventin, 1990). Esta especie pone casi invariablemente dos huevos, cuyos períodos aproximados de incubación son de 37 días para el primero y 35 días para el segundo (Bost y Jouventin 1991). Luego del nacimiento y cuidado parental, los polluelos quedan bajo un cuidado grupal, que se desarrolla entre los 25 - 30 días de edad (Davis y Renner, 2003). La muda de plumaje comienza aproximadamente a los 38 días y termina a los 85 días (Bost y Jouventin, 1991). Entre los días 80 y 105 los polluelos ya están aptos para salir al mar, sin embargo, estos juveniles continuarán retornando a la colonia para ser alimentados por sus progenitores durante 5 a 50 días (Davis y Renner, 2003). La estructura de los nidos depende de la zona geográfica y de la disponibilidad de recursos para su construcción,

dentro de los materiales empleados para esto, se encuentra el uso de vegetación y rocas pequeñas, en las islas sub-antárticas y en la península antártica, respectivamente (Bost y Jouventin, 1990).

La Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN) clasifica a esta especie dentro de la categoría Casi Amenazada (IUCN, 2015). Las principales amenazas para la conservación de pingüinos incluyen la extracción de huevos, competencia de recursos con las pesquerías, pesca incidental (*bycatch*), contaminación marina y la potencial aparición de enfermedades introducidas (Trathan *et al.*, 2014).

4.2 Agentes Infecciosos en la Avifauna Antártica

El territorio Antártico tiene un gran aislamiento geográfico en relación al resto de los continentes, probablemente por esta razón muchas enfermedades distribuidas en otras latitudes están ausentes en sus poblaciones animales (Kerry *et al.*, 1998). Pese a esto, se han desarrollado estudios que confirman la existencia de microorganismos y agentes infecciosos dentro de este continente.

Uno de los principales patógenos que posee investigaciones en la Antártica son los paramixovirus aviáres (APMV), agentes que serían endémicos y se distribuirían ampliamente entre las poblaciones de aves marinas de la zona (Woods *et al.*, 2009). Dentro de los principales hallazgos de paramixovirus aviáres, se puede mencionar el aislamiento de los serotipos 7 y 8 (APMV-7 y APMV-8) en pingüino adelia (*Pygoscelis adeliae*) (Morgan y Westbury, 1981), el aislamiento de una cepa lentogénica del virus de la enfermedad de Newcastle (APMV-1) en pingüino real (*Eudyptes schlegeli*) (Alexander *et al.*, 1989); así como también el aislamiento de paramixovirus aviáres distintos del agente causal de esta misma enfermedad, desde muestras cloacales de la misma especie de pingüino (Morgan y Westbury, 1988; Austin y Webster, 1993). En relación a la detección indirecta, en pingüinos adelia (*Pygoscelis adeliae*) se

han encontrado anticuerpos contra los agentes APMV-3 y APMV-8 (Morgan y Westbury, 1981). Recientemente, en la isla del Rey Jorge se aislaron dos virus pertenecientes a APMV-1, obtenidos desde muestras cloacales de pingüino adelia (*Pygoscelis adeliae*), además, un 33,3% de los pingüinos estudiados resultaron tener serología positiva frente a dicho virus (Thomazelli *et al.*, 2010). Los pingüinos no son las únicas aves que han resultado ser seropositivas a los paramixovirus aviáres, puesto que también se ha encontrado evidencia serológica en págalos antárticos (*Catharacta maccormicki*) (Austin y Webster, 1993; Miller *et al.*, 2008).

A pesar de que la presencia de anticuerpos no implica necesariamente una manifestación clínica de la enfermedad, hay antecedentes de desarrollo de la enfermedad en un pingüino adelia (Pierson y Pforr, 1975 citado por Woods *et al.*, 2009) en cautiverio.

Los virus de influenza aviar también se han identificado en el territorio antártico y sub-antártico, por esta razón, se presume que estos son endémicos o introducidos constantemente por aves migratorias en la zona (Wallensten *et al.*, 2006). Existen hallazgos serológicos de la presencia de este virus en págalos antárticos (*Catharacta maccormicki*) (Austin y Webster, 1993; Miller *et al.*, 2008), pingüinos de papúa (*Pygoscelis papua*) de Georgia del Sur (Wallensten *et al.*, 2006), pingüinos adelia (*Pygoscelis adeliae*) del mar de Ross (Austin y Webster, 1993) y de la Antártica (Morgan y Westbury, 1981; Baumeister *et al.*, 2004), así como también en pingüinos barbijo (*Pygoscelis Antarctica*) y petreles gigantes (*Macronectes giganteus*) del continente antártico (Baumeister *et al.*, 2004). Además, recientemente se logró detectar influenza A H11N2 en pingüinos adelia (*Pygoscelis adeliae*), lo que correspondería al primer aislamiento de este virus en el continente antártico (Hurt *et al.*, 2014).

A pesar de que en la actualidad existe información de agentes virales dentro del ecosistema antártico, el estudio ecológico de estos aún es limitado en lo que

respecta a los efectos asociados a ellos, así como también su diversidad e importancia ecológica (Kerry *et al.*, 1998; Grimaldi *et al.*, 2014). Las ausencias de antecedentes incrementan la preocupación relacionada al potencial impacto de estos agentes infecciosos sobre el estado de conservación de las aves antárticas (Pearce y Wilson, 2003).

En lo que respecta a microorganismos bacterianos, se puede señalar que se ha encontrado *Salmonella* spp. en fauna del territorio antártico (Oelke y Steiniger, 1973) y sub-antártico (Palmgren *et al.*, 2000). También se ha comprobado la existencia de *Campylobacter lari* (Leotta *et al.*, 2006a) y *Campylobacter jejuni* (Griekspoor *et al.*, 2009) en diversas aves marinas continentales. Además, a partir de muestras provenientes de un petrel gigante (*Macronectes giganteus*), se aisló *Pasteurella multocida*, agente causal de la cólera aviar (Leotta *et al.*, 2003). Esta misma bacteria, estuvo involucrada en dos brotes con mortalidad asociada en avifauna antártica (Leotta *et al.*, 2006b).

4.3 Paramixovirus Aviaries (APMV)

Los paramixovirus aviaries corresponden al género *Avulavirus*, que pertenece a la subfamilia *Paramyxovirinae*, familia *Paramyxoviridae* y al orden *Mononegavirales* (Zohari y Munir, 2013). De acuerdo al *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV), los paramixovirus aviaries (APMV) se clasifican en 12 especies distintas (ICTV, 2017), históricamente existían nueve serotipos (APMV-1 hasta APMV-12) a través de los ensayos de inhibición de hemoaglutinación (OIE, 2012). Sin embargo, recientemente se han descrito nuevos paramixovirus aviaries (Miller *et al.*, 2010; ICTV, 2017).

En lo que respecta a la clasificación de los APMV-1, estos se pueden agrupar como agentes virales de Clase I o Clase II; en base a la caracterización genómica y secuenciación de los fragmentos F y L (Zohari y Munir, 2013). Los virus que pertenecen a la Clase I están distribuidos globalmente, son de baja

virulencia y su principal reservorio son las aves acuáticas silvestres (Alexander, 2011). Además, se subdividen en nueve genotipos distintos y poseen el genoma más amplio, con 15.198 nucleótidos (Zohari y Munir, 2013). Los miembros de la clase II se encuentran en aves comerciales y en aves acuáticas silvestres y considera a casi todos los APMV-1 que han causado brotes de la enfermedad. Al igual que los de Clase I, también poseen nueve genotipos, pero se diferencian en que tienen un genoma más corto que ellos (Zohari y Munir, 2013).

A su vez, las diferentes cepas de APMV - 1 pueden ser clasificadas en cinco patotipos, en base a la severidad de la signología clínica que producen en pollos infectados (Alexander, 2011): en primer lugar, se encuentran las cepas velogénicas, altamente virulentas y letales, que se subdividen en dos. La cepa velogénica viscerotrópica que se caracteriza por generar lesiones hemorrágicas intestinales y la cepa velogénica neurotrópica, que ocasiona signos respiratorios y nerviosos. Las cepas mesogénicas que poseen moderada virulencia y desarrollan signología respiratoria y/o nerviosa (Panda *et al.*, 2004). El patotipo lentogénico que puede generar enfermedades respiratorias moderadas o subclínicas. Por último, existen las cepas asintomáticas, que usualmente cursan con cuadros entéricos inaparentes (Alexander, 2011).

4.3.1 Características Virales

El genoma de los APMV es de RNA hebra simple, no segmentado y con polaridad negativa (Gogoi *et al.*, 2015). La nucleocápside tiene una simetría helicoidal y se encuentra cubierta por una gran membrana pleomórfica (Samson, 1988). Su genoma codifica seis proteínas virales (Imagen 2), que incluyen una proteína de la nucleocápside (N), fosfoproteína (P), proteínas de la matriz (M), proteína de fusión (F), hemoaglutinina-neuroaminidasa (HN) y la polimerasa RNA dependiente de RNA (L) (Leeuw y Peeters, 1999).

La estructura de la nucleocápside está conformada por la asociación de las proteínas virales N, P, L y el RNA viral (Samal, 2011). Las proteínas M, F y HN están asociadas con la envoltura viral, que proviene de la membrana de las células hospederas (Gogoi *et al.*, 2015). De estas tres proteínas, la M no es una proteína integral de membrana y cumple la función de conformar la lámina interna de la envoltura viral (Samal, 2011). Por su parte, las proteínas HN y F son glicoproteínas integrales de la envoltura viral (Panda *et al.*, 2004) y los antígenos neutralizantes del virus. La proteína HN está involucrada principalmente con las funciones de acoplamiento a los receptores de la célula blanco, mientras que la glicoproteína F interviene en la unión de la envoltura viral y celular, lo que permite el ingreso de la nucleocápside al interior de la célula hospederas (Scheid y Choppin, 1974).

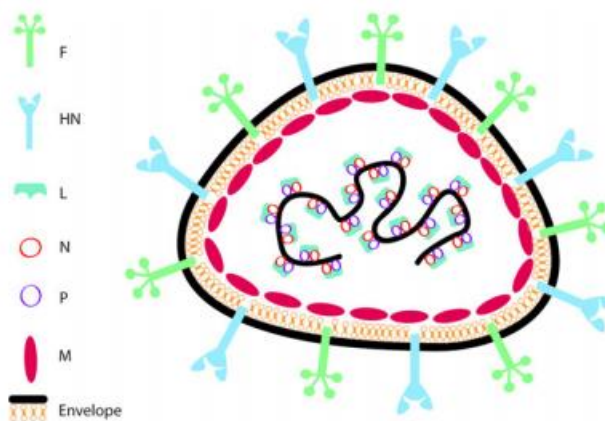


Imagen 2: Estructura de los paramixovirus aviares. Externamente poseen una envoltura lipídica derivada de la célula hospederas, a la cual están asociadas la glicoproteína hemoaglutinina (HN) y la glicoproteína de fusión (F). La proteína de matriz viral (M) cubre internamente la envoltura lipídica. Internamente, el RNA monocatenario (-) se asocia con la proteína de nucleocápside (N), fosfoproteína (P) y polimerasa dependiente de RNA (L). Fuente: (Gogoi *et al.*, 2015).

4.3.2 Diagnóstico de Paramixovirus Aviaries (APMV)

Existen técnicas serológicas y moleculares para el diagnóstico de estos agentes virales, empleándose cada una de ellas de acuerdo al tipo de muestra biológica que se posea para analizar. Dentro de la recolección de material biológico, las muestras cloacales son ideales para la detección exitosa de los paramixovirus aviaries (Zohari y Munir, 2013), puesto que se puede aislar el agente viral y eventualmente tener acceso a su genoma. La inoculación de huevos embrionados con muestras en las que se sospecha la existencia de paramixovirus aviaries, es la técnica más sensible para el aislamiento de este grupo de virus (Zohari y Munir, 2013).

La evaluación indirecta de la presencia de paramixovirus en medios de cultivo, como los huevos embrionados, se aprovecha de una habilidad particular que poseen estos virus, que consiste en unirse a los eritrocitos y provocar hemoaglutinación (McGinnes *et al.*, 2006). La actividad hemoaglutinante es altamente sugerente de la presencia de paramixovirus aviaries, pero no constituye un método de identificación (Spackman y Killian, 2014), por lo que la confirmación del agente requiere de otros procesos. Las técnicas de análisis molecular han cobrado gran importancia en la identificación de patógenos, específicamente en lo que respecta a los paramixovirus aviaries, la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) está especialmente descrita para la identificación del virus causal de la enfermedad de Newcastle (APMV-1), no obstante, la detección molecular para el resto de los paramixovirus aviaries aún es muy limitada (Zohari y Munir, 2013). En relación a este hecho, se ha desarrollado recientemente una técnica capaz de detectar a todos los virus conocidos dentro de la familia *Paramyxoviridae* (Van Boheemen *et al.*, 2012), que permitiría obtener una aproximación rápida a la presencia de todos los paramixovirus aviaries en un solo ensayo molecular.

4.4 Enfermedad de Newcastle

El paramixovirus aviar serotipo I (APMV-1), agente causal de la enfermedad de Newcastle, es el miembro más estudiado de todos los paramixovirus aviáres, producto de las severas enfermedades que ocasionan sus cepas en la industria avícola (Gogoi *et al.*, 2015). Esta enfermedad se ha descrito en 27 de los 50 órdenes de aves, con una cantidad estimada de 241 especies de aves domésticas y silvestres afectadas (Kaleta y Baldauf, 1988). Posiblemente y gracias a este amplio rango de hospederos susceptibles el virus ha logrado establecerse alrededor del mundo (Hines y Miller, 2012).

Los métodos de transmisión son principalmente horizontales, fundamentalmente a través del contacto con descargas nasales o heces provenientes de un individuo infectado, dado que la replicación viral se desarrolla en el tracto respiratorio y/o gastrointestinal (Zohari y Munir, 2013). Existen diversas posibles formas de diseminación ambiental del virus (Alexander, 1988), dentro de las cuales se encuentra su persistencia y dispersión por fuentes de agua. En relación a esto, se conoce que el APMV-1 es capaz de permanecer viable por un período de hasta 370 días a 4°C (Davis-Fields *et al.*, 2014).

Considerando todos los paramixovirus aviáres conocidos, se sabe que solamente APMV-1 es capaz de replicar en especies no aviáres, dentro de las cuales se incluye el hombre (Zohari y Munir, 2013). Las infecciones en humanos generalmente provocan una enfermedad debilitante por uno o dos días (Alexander, 2000), siendo la conjuntivitis la principal presentación clínica de la enfermedad (Swayne y King, 2003). Sin embargo, se identificó una cepa de APMV-1 en un paciente inmunodeprimido que murió a causa de neumonía, lo que correspondería al primer registro de asociación entre este virus y mortalidad en humanos (Goebel *et al.*, 2007). Pese a este antecedente, no existe evidencia de transmisión entre personas (OIE, 2012).

Debido a los costos sanitarios y económicos que puede generar la enfermedad de Newcastle, los brotes de esta deben ser reportados a la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) (Zohari y Munir, 2013). En lo que respecta a nuestro país, la enfermedad provocada por este virus es de denuncia obligatoria (SAG, 2015).

A pesar de que se conoce el impacto de APMV-1 en las aves domésticas, aún se desconoce el efecto de este y el resto de los paramixovirus aviares sobre la avifauna del ecosistema antártico. Por esta razón, resulta de vital importancia obtener información que aproxime a conocer el rol epidemiológico que cumplen los pingüinos dentro de la diseminación de los paramixovirus aviares, las cepas que circulan dentro del ambiente antártico y el virtual peligro que representan estos agentes para las aves que habitan el continente austral.

5 HIPÓTESIS

De acuerdo a la información disponible, referente a las especies de pingüinos y al área geográfica en estudio, la hipótesis de esta Tesis es que existen paramixovirus aviáres circulando en las poblaciones silvestres de pingüino papúa (*Pygoscelis papua*) del territorio Antártico chileno.

6 OBJETIVO GENERAL

Aislar e identificar paramixovirus aviáres en pingüinos papúa (*Pygoscelis papua*), provenientes de colonias reproductivas de la Península Antártica.

7 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar e identificar paramixovirus presentes en pingüinos papúa (*Pygoscelis papua*) del territorio Antártico chileno.
2. Determinar paramixovirus aviáres, diferenciándolos entre sus especies conocidas.

8 MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Colección de Muestras

La toma de muestras se desarrolló en el territorio antártico chileno (ver Imagen 3) en el marco del proyecto INACH T12-13, que consideró dos expediciones. La primera expedición de toma de muestras se efectuó durante los meses de enero y febrero de 2014. Se recolectó un total de 262 muestras cloacales de pingüino papúa (*Pygoscelis papua*) en las colonias reproductivas ubicadas en la Isla Kopaitic (63°19' S, 57°55'W) y en la Base Presidente Gabriel González Videla (64°49'S, 62°51'W), con una cantidad de 132 y 130 muestras para cada sector, respectivamente.

La segunda campaña también se llevó a cabo en la Península Antártica, durante los meses de enero y febrero de 2015. Se obtuvieron 83 muestras de heces frescas (ambientales) de pingüino papúa (*Pygoscelis papua*) en colonias reproductivas ubicadas en Dorian Bay (64°49'S, 63°30'W), Base Brown (64°53'S, 62°52'W) y Pleneau Island (65°06'S, 64°04'W), con una cantidad de 22, 17 y 44 muestras para cada lugar, respectivamente. La toma de muestras fue realizada en poblaciones de animales sanos, por lo que consideramos poco probable la detección de agentes virales de alta patogenicidad, como el virus de Influenza A altamente patógeno y las cepas velogénicas de Newcastle (APMV-1).

La captura de los pingüinos se llevó a cabo con un chinguillo, siguiendo el protocolo de manejo de pingüinos (Wilson, 1997). Una vez capturados, se recolectaron las muestras cloacales con tómulas de algodón y fueron depositadas en criotubos que poseían un medio viral enriquecido, (Medio Mínimo Esencial, Tripsina TPCK 1X, 0,3% de Seroalbúmina bovina y 1% de solución antibiótica-antimicótica que contiene penicilina, estreptomycinina y anfotericina B). Las muestras de heces frescas fueron obtenidas desde el suelo

usando tómulas estériles, siguiendo el mismo procedimiento de las muestras cloacales. Una vez concluida la recolección, las muestras fueron transportadas en hielo e inmediatamente fueron congeladas a -80°C .

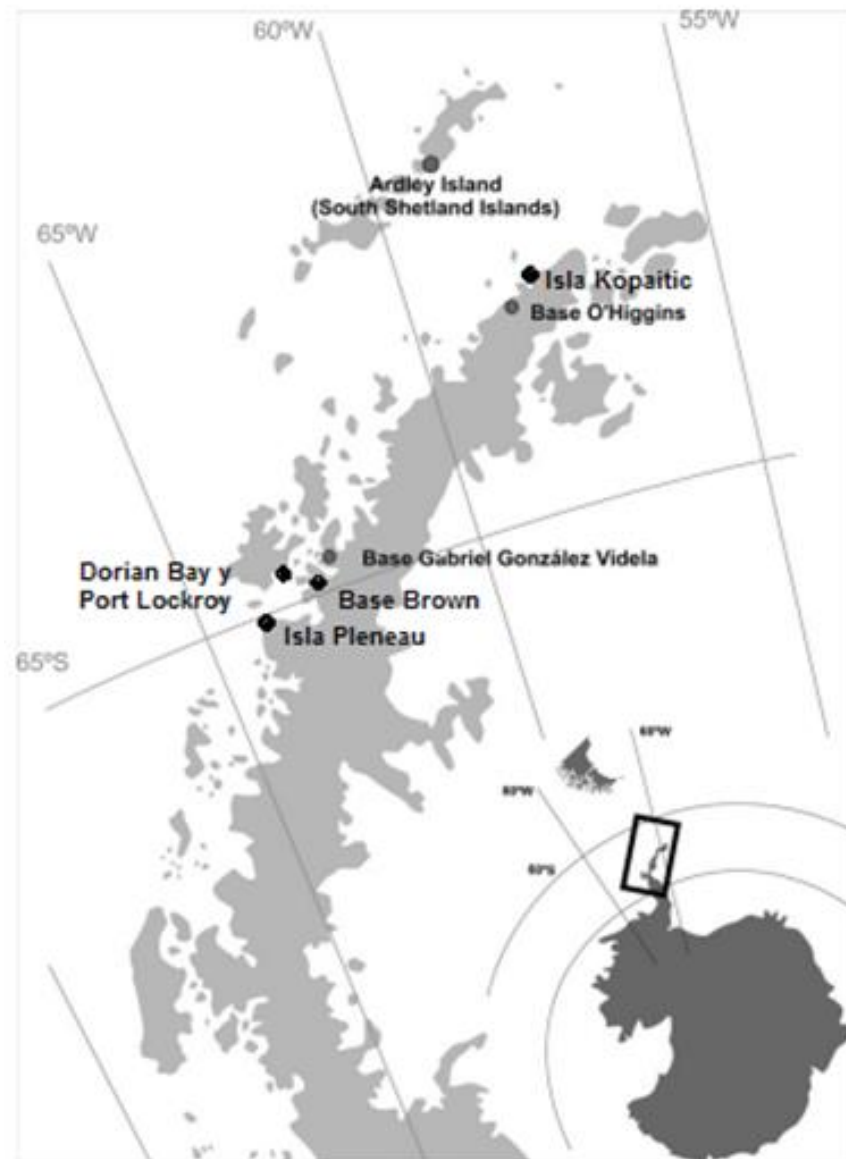


Imagen 3: Mapa Península Antártica, Ubicación de los lugares de muestreo (Modificado desde González-Acuña *et al.*, 2013).

8.1.1. Pruebas Diagnósticas

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Virología Animal, del Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

8.1.2. Procesamiento de muestras

Para el caso de las muestras del año 2014, estas se agruparon en *pooles*, con la finalidad de maximizar tiempo y material biológico (disminución del uso de huevos embrionados). Cada pool contuvo entre 3 y 5 muestras, generándose así 54 *pooles*. Las muestras aportaron con un volumen de 200 µL para formar cada *pool*. En caso de existir *pooles* positivos, las muestras pertenecientes a ellos fueron analizadas individualmente. A diferencia de las muestras anteriores, aquellas que fueron obtenidas durante la campaña de 2015 se inocularon individualmente y sin la previa formación de *pooles*, puesto que correspondían a muestras ambientales.

8.2. Aislamiento Viral

8.2.1. Inoculación de Huevos Embrionados

Se obtuvieron huevos embrionados de 9 a 11 días de edad en el Instituto de Salud Pública de Chile (ISP). En el laboratorio, se evaluó con un ovoscopio el estado general de cada uno de los huevos, para evaluar viabilidad. Aquellos que se encontraban en mal estado, quebrados o muertos fueron descartados de los procedimientos posteriores (Balish *et al.*, 2013). A cada huevo seleccionado se le delimitó con un lápiz la cámara de aire, la ubicación del embrión y contrario a este, el sitio propicio para la inoculación; considerando a este como el lugar que careciera de vasos sanguíneos de calibre importante.

La preparación de las muestras previo a la inoculación, consideró la adición antibiótico y antimicótico (Laboratorio Corning) a una concentración final en la muestra a 1X. Luego, cada muestra fue centrifugada a 1945 G por 8 minutos, descartando el pellet. Las muestras preparadas fueron refrigeradas a 4°C hasta el momento de la inoculación.

Las inoculaciones se realizaron en una cámara de flujo laminar, siguiendo las buenas prácticas de laboratorio descritas en las secciones posteriores. Antes de comenzar con el procedimiento, se dispensó alcohol (70%) sobre la cáscara de los huevos destinados a inocular e inmediatamente después del secado de estas, se procedió a perforar las cáscaras con lancetas de glicemia, a través de los lugares estipulados con anterioridad. Se introdujo verticalmente por medio de este agujero 0,2 ml de la muestra preparada (jeringa de 1 ml) y una vez finalizado este paso, se sellaron los orificios con pegamento (Cola fría Artel). Todas las muestras fueron inoculadas por duplicado; ya que de esta forma se disminuye la probabilidad de perder muestras debido a la mortalidad inespecífica de los huevos embrionados. Los huevos fueron debidamente rotulados con su código de identificación y fecha de inoculación. Después de terminado el proceso, estos fueron dispuestos en una incubadora a 37 ° C por un periodo de siete días.

Se corroboró diariamente la viabilidad de los huevos embrionados inoculados, procurando recolectar rápidamente el líquido alantoideo de los ejemplares muertos. La mortalidad embrionaria dentro de las primeras 24 horas post-inoculación fue considerada como inespecífica, de acuerdo a lo estipulado en el Manual de Laboratorio de los virus de Influenza y Newcastle (Terregino y Capua, 2009). Al concluir el último día de incubación, se indujo mortalidad embrionaria mediante la refrigeración de los huevos a 4°C por 12 horas. Se consideraron, como mínimo, dos pasajes en huevos embrionados para declarar las muestras como negativas a la presencia de paramixovirus aviares.

El desarrollo de esta técnica permitió el aislamiento y amplificación viral desde las muestras estudiadas, siendo también decisiva para demostrar la viabilidad de dichos agentes (Spackman y Killian, 2014); lo que facilitó la realización de los análisis moleculares posteriores.

8.2.2. Recolección de Líquido Alantoideo

Para extraer el líquido alantoideo, se quebró con pinzas estériles la cáscara de cada huevo, de esta manera se expuso la membrana alantoidea; que una vez escindida permitió el acceso a este fluido. La recolección se llevó a cabo con una pipeta estéril (10 ml), por el lado contrario al que se ubicaba el embrión y resguardando en todo momento la integridad de la yema. Posterior a la extracción del líquido, el embrión fue triturado para asegurar su muerte. Las muestras extraídas fueron almacenadas en tubos Falcon (15 ml), puesto que el volumen promedio de líquido alantoideo en un huevo varía de 3 y 10 ml (McGinnes *et al.*, 2006). Inmediatamente después de la recolección, cada tubo fue debidamente rotulado con su número de identificación correspondiente y con su fecha de extracción.

8.2.3. Prueba de Hemoaglutinación (HA)

Para la realización de esta prueba, se obtuvo sangre de pavo (preservada en EDTA) desde el ISP. Esta sangre se debió someter a un lavado de glóbulos rojos, para esto; se añadieron 3 a 5 ml de sangre entera en un matraz, que fue rellanada con PBS (1x) hasta obtener un volumen de 50 ml. Esta mezcla fue homogenizada delicadamente y posteriormente centrifugada a 800 G por 10 minutos. El sobrenadante fue descartado, mientras que el pellet se lavó nuevamente con PBS (1x) y fue centrifugada, bajo las mismas condiciones descritas previamente. El proceso de lavado se repitió tres veces. Una vez completado esto, se extrajo 1 ml desde el pellet de eritrocitos y se añadieron a 199 ml de PBS (1x) en un matraz de 250 ml, dando como resultado la obtención

de una sangre diluida al 0,5%. Esta dilución de sangre es la que se utilizó para desarrollar la prueba de HA.

Las diluciones se llevaron a cabo en placas de microtitulación de 96 pocillos, con fondo en forma de U. El primer paso consistió en la distribución de 50 μ L de PBS (1x) en todos los pocillos. Luego se adicionaron 50 μ L de muestra (líquido alantoideo) en la primera fila/columna de la placa correspondiente, e inmediatamente; se ejecutaron diluciones en base de dos, que consistieron en transferir un volumen de 50 μ L desde el primer pocillo hacia el pocillo ubicado a la derecha, mezclando adecuadamente con la pipeta y repitiendo el proceso hasta completar la fila/columna. Es importante señalar, que todos los pocillos debían poseer un volumen final de 50 μ L. Después de completar todas las diluciones, se dispensó 50 μ L de sangre al 0,5% en cada pocillo y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente, observando los resultados luego de cumplir este lapso de tiempo.

Se consideraron como muestras positivas aquellas en las que se observó un entramado difuso recubriendo uniformemente el fondo del pocillo, lo que corresponde a la aglutinación eritrocitaria ocasionada por las partículas virales, que impiden la decantación de los hematíes por gravedad (Imagen 4). Por el contrario, las muestras negativas fueron aquellas en las que los eritrocitos se depositaron por gravedad en el fondo de los pocillos y formaron el característico botón de sedimentación (Imagen 4). Todas las pruebas de HA desarrolladas, incluyeron la presencia de un control positivo y negativo; utilizando para ello, un virus de influenza aviar aislado en el Laboratorio de Virología Animal (FAVET) y PBS (1x), respectivamente.

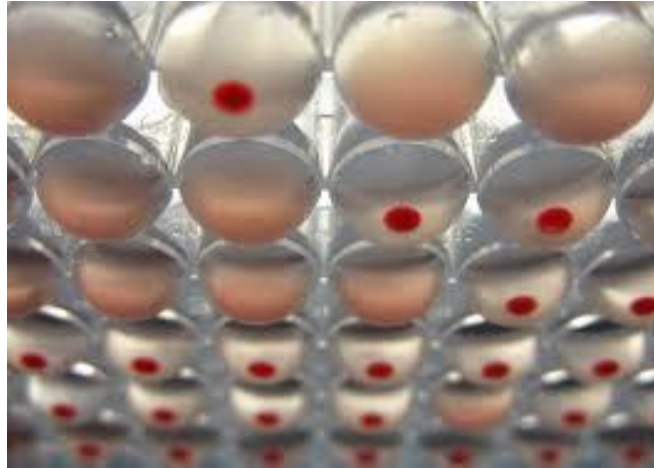


Imagen 4: Prueba de hemoaglutinación. **Muestras positivas** se observan como un entramado difuso que recubre el fondo de los pocillos; mientras que las **muestras negativas** se observan como un botón rojo, claramente definido en el fondo de los recipientes.

La aplicación de esta herramienta diagnóstica nos permitió obtener evidencia de la presencia de agentes hemoaglutinantes, a partir de los aislamientos efectuados con los huevos embrionados. De esta manera, esta prueba estableció el punto de corte o de discriminación entre las muestras sospechosas con evidencia científica y las muestras negativas, que inmediatamente fueron descartadas de los análisis posteriores. Los principales agentes hemoaglutinantes son los paramixovirus aviares y los virus de influenza A, por esto; es importante comprender que esta prueba no representa un ensayo de identificación viral (Balish *et al.*, 2013).

8.3. Identificación Molecular de Paramixovirus Aviares (APMV)

8.3.1. Extracción del Material Genético

La extracción del material genético se desarrolló a partir de las muestras positivas a los ensayos de hemoaglutinación, utilizando para ello el kit comercial “High Pure Viral Nucleic Acid”, del laboratorio Roche. El procedimiento se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

8.3.2. Diagnóstico Molecular de los Paramixovirus Aviares (APMV)

La prueba de diagnóstico molecular utilizada, consistió en un RT-PCR que detecta a todos los virus conocidos dentro de la familia *Paramyxoviridae*, técnica que fue desarrollada por Van Boheemen (Van Boheemen *et al.*, 2012). Los partidores fueron diseñados para amplificar un sector conservado del gen de la RNA polimerasa dependiente de RNA, específicamente aquellos que corresponden al dominio III de la proteína viral. La secuencia de los partidores usados fue la siguiente: Forward PMX1 5'- GAR-GGK-YKK-TGY-CAR-AAR-NTN-TGG-AC -3' y Reverso PMX2 5'- TKA-YKG-CWA-TKR-KYT-GRT-TRT-CNC-C -3'. En dichos partidores, las siglas G, C, A y T simbolizan a nucleótidos normales, mientras que las siglas K, Y, W, R y N representan a nucleótidos degenerados, que poseen la siguiente decodificación: K (G ó T), Y (C ó T), W (A ó T), R (A ó G) y N, que simboliza a cualquier nucleótido (A, C, T y G). El fragmento génico obtenido a partir del RT-PCR tiene un tamaño aproximado de 121 pares de bases (pb), que se reducen a 70 pb al excluir los partidores.

La reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) se llevó a cabo con el kit comercial AgPath-ID™ One Step, del laboratorio Thermo Fisher Scientific. La reacción poseía 1 µL de PMX1 a una concentración de 10 µM, 1 µL de PMX2 a una concentración de 10 µM, 1 µL de DNA polimerasa one step AgPath-ID a una concentración de 1x, 12,5 µL de buffer AgPath-ID, 6 µL

de agua y 3 μL de muestra, dando un volumen final de 25 μL de reacción. El perfil térmico que se empleó, consideró el siguiente protocolo: Incubación inicial de 10 minutos a 45°C, denaturación inicial de 10 minutos a 95°C, luego 35 ciclos de PCR con denaturación de 15 segundos a 95°C, hibridación de 30 segundos a 55°C, extensión de 20 segundos a 72°C y para finalizar una extensión final de 7 minutos a 72°C. Los productos de PCR se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 2%, gel que posteriormente fue teñido con bromuro de etidio. El tamaño de los amplicones generados se estimó con la ayuda del DNA ladder 100bp, del laboratorio Fermentas.

El control positivo del PCR fue un extracto purificado del RNA de una cepa de campo del virus de Newcastle, obtenido y transportado desde Estados Unidos en tarjetas Whatman™ FTA™, GE Healthcare Life Sciences. Para extraer el material genético desde las tarjetas, estas se cortaron en pequeños fragmentos y se dispusieron en tubos eppendorf de 1,5 ml, a los que se les adicionaron 200 μL de buffer de elusión de ácidos nucleicos virales (Roche Diagnostics). La mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente, siendo posteriormente centrifugada a 2430 G por 5 min. Una vez finalizada la centrifugación, se formaron alícuotas de 20 μL desde las elusiones y se congelaron a -80°C, en una caja destinada exclusivamente para estos controles.

8.3.3. Secuenciación y Análisis Filogenético

Los productos amplificados fueron purificados a partir del gel de agarosa con el kit comercial GenElute™ Gel extraction kit (Sigma-Aldrich™), de acuerdo a las instrucciones estipuladas por su fabricante. La cantidad de material genético disponible en las soluciones purificadas se cuantificó por espectrofotometría. Las muestras purificadas y cuantificadas se enviaron a Macrogen, para ser secuenciadas mediante la técnica de Sanger.

Una vez obtenidas las secuencias, se evaluaron a través de BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), para obtener una aproximación con respecto a la identidad de estas. Las secuencias se introdujeron al programa *Nucleotide BLAST*, usando el criterio de buscar secuencias algo parecidas (*somewhat similar sequences*). De acuerdo a los resultados y a los porcentajes de identidad, se procedió a confirmar la presencia de paramixovirus. En una base de datos, se almacenaron las secuencias propias y una selección de secuencias de referencia de los paramixovirus publicados en la actualidad, obtenidas a través de *Genbank*. Luego de esto, las secuencias fueron alineadas con *Clustal W* y verificadas visualmente. El alineamiento se analizó a través de *JModelTest*, con el objetivo de identificar el mejor modelo de sustitución para el análisis filogenético final, que fue ejecutado con *Maximum Likelihood*. Además, se realizaron comparaciones pareadas de nucleótidos y aminoácidos, para identificar el número de diferencias entre todas las secuencias contrastadas. Todos los análisis fueron desarrollados en la plataforma MEGA 6.0.

8.4. Bioseguridad y Bioética

Los materiales infecciosos son clasificados dentro de grupos de riesgo en base al peligro que estos representan. En esta materia, los virus de influenza A y el paramixovirus-1 (APMV-1) se sitúan en el Grupo de Riesgo II de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), puesto que pueden causar enfermedad tanto a humanos como animales, pero con baja probabilidad de diseminación en la población humana y/o animal, además de existir tratamientos contra ambas (OIE, 2012). Para contener adecuadamente a estos agentes en un laboratorio se requieren cabinas de bioseguridad de clase I, II o III; debido a la posible generación de aerosoles, que implican un riesgo de infección al personal y de contaminación cruzada a las muestras biológicas en estudio (OIE, 2012).

En este contexto, elaboramos un protocolo de trabajo en laboratorio que fue aceptado por el Comité de Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile (Anexo 6). Dentro de las principales medidas de bioseguridad utilizadas en la investigación se encuentra el uso de campana de bioseguridad tipo II, diseñada para brindar protección al operador, muestra y ambiente. Todos los procedimientos que implicaron la manipulación de material biológico sospechoso a la presencia de alguno de estos virus, se desarrollaron dentro de esta campana de bioseguridad. Otro punto importante fueron las buenas prácticas de laboratorio, que son fundamentales para optimizar los trabajos con muestras biológicas, puesto que disminuyen el riesgo de exposición a fuentes infecciosas y la posibilidad de contaminación cruzada entre las muestras estudiadas. Estas prácticas consideraron el uso de delantal, guantes y mascarilla; así como también, el lavado de las manos inmediatamente después de la remoción de los guantes (Dundon, 2009). Adicionalmente, antes y después de la realización de cualquier procedimiento, superficies y materiales fueron descontaminados con etanol 70%.

Se obtuvo el certificado de bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, lo que nos autorizó a trabajar con huevos embrionados en el desarrollo de los aislamientos virales (Anexo 7).

Los huevos embrionados inoculados con muestras biológicas, así como también todos los productos biológicos contaminados, se procedieron a desechar dentro de bolsas de disposición de materiales biológicos peligrosos. Previo a su eliminación, las bolsas se pasaron por autoclave, a una temperatura de 250° F y 13 libras/pulgada² (psi) de presión.

9. RESULTADOS

9.1. Aislamiento Viral

Del total de 345 muestras cloacales/ambientales analizadas y cultivadas en huevos embrionados, 13 evidenciaron actividad hemoaglutinante. Esta cifra corresponde al 3,76% del total de sospechosos analizados. De estas 13 muestras, 12 fueron recolectadas durante la campaña de 2014 en la Isla Kopaitic; mientras que la restante, se obtuvo el 2015, en la localidad denominada Dorian Bay (ver Cuadro 1). La mayoría de las muestras sospechosas evidenciaron actividad hemoaglutinante luego del primer pasaje en huevos embrionados; no obstante, 2 *pooles* requirieron de un pasaje adicional para demostrar dicha reacción (ver Anexo 1). Los antecedentes morfológicos de los individuos positivos de la campaña de 2014 se encuentran detallados en el Anexo 4.

Muestras	Procedencia	Campaña	Mayor título HA
47	I. Kopaitic	2014	(1/16)
66	I. Kopaitic	2014	(1/2)
84	I. Kopaitic	2014	(1/32)
86	I. Kopaitic	2014	(1/16)
88	I. Kopaitic	2014	(1/128)
104	I. Kopaitic	2014	(1/32)
110	I. Kopaitic	2014	(1/64)
116	I. Kopaitic	2014	(1/4)
117	I. Kopaitic	2014	(1/16)
124	I. Kopaitic	2014	(1/64)
126	I. Kopaitic	2014	(1/4)
132	I. Kopaitic	2014	(1/32)
42	Dorian Bay	2015	(1/4)

Cuadro 1: Aislamientos positivos a hemoaglutinación. Muestras cultivadas en huevos embrionados que evidenciaron actividad hemoaglutinante, por Consiguiente; sospechosas a la presencia de paramixovirus aviares (APMV). Para obtener más antecedentes de dichas muestras ver Anexos 1, 2 y 3.

9.2. Reacción de la polimerasa en cadena con transcriptasa inversa (RT-PCR)

Las muestras hemoaglutinantes fueron sometidas a RT-PCR para la detección de paramixovirus aviares (APMV). De ellas, cinco resultaron positivas al ensayo molecular, prueba en la que evidenciaron productos de aproximadamente 120 pares de bases (pb) y en la que no se observaron amplificaciones inespecíficas. Los individuos positivos a esta prueba corresponden a los códigos 86, 104, 110, 117 y 132; todos ellos pertenecientes a la campaña de recolección de 2014, que fue efectuada en Isla Kopaitic. En términos porcentuales podemos señalar que, del total de muestras originales, el 1,45% resultó tener agentes virales de la familia *Paramyxoviridae*.

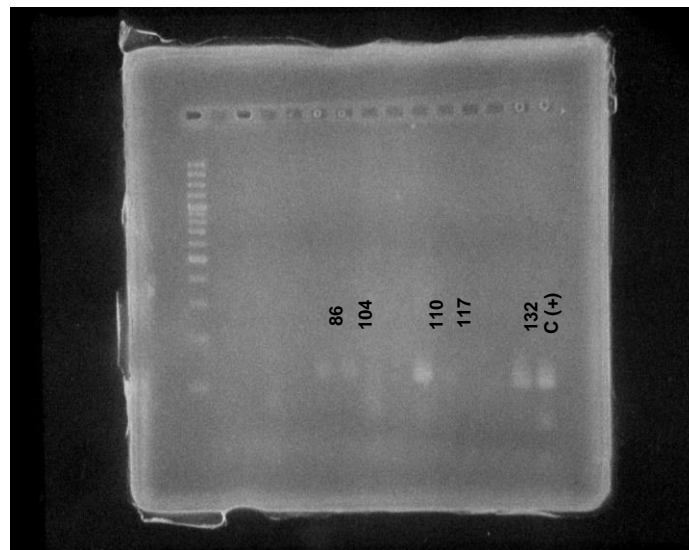


Imagen 5: Resultados del RT-PCR para la familia *Paramyxoviridae*. Las muestras 86, 104, 110 y 132 evidenciaron una amplificación clara, de aproximadamente 120 pb y similar a la descrita por nuestra referencia (Van Boheemen *et al.*, 2012). Por su parte, la muestra 117 mostró una banda muy tenue.

9.3. Secuenciación y BLAST

Las cinco muestras positivas al RT-PCR de paramixovirus fueron purificadas desde el gel y secuenciadas con el método de Sanger. De estas, solo las secuencias correspondientes a los individuos 86, 110 y 132 consiguieron pasar el control de calidad, mientras que las restantes fueron descartadas. Después de que se ratificara la presencia de APMV en los aislamientos con actividad hemoaglutinante, se llevó a cabo la secuenciación de sus genomas completos con MiSeq® System, Illumina®. Las secuencias derivadas de esta técnica fueron las utilizadas para los análisis filogenéticos, debido principalmente al ruido que presentaban las señales emanadas por la metodología de Sanger. Las secuencias finales se encuentran detalladas en la Imagen 6. Estas secuencias se analizaron a través de Blast y lograron ser identificadas como APMV, al resultar ser similares a los APMV-12 y APMV-13 con porcentajes de identidad de 79 y 84%; hecho que fue confirmado posteriormente por medio del análisis filogenético.

1. Penguin_Paramyxovirus_A	GATGATATCCATATCTGCTATCAACCTGGCTGCAGCCCGACCTGGCTGTAAGAGTGGCTTGCATGGTTCAAG
2. Penguin_Paramyxovirus_B	CATGATCTCAATCTCTGCAATCAACCTGGCCCGCACGTTCCAACTGCAAGAGTGGCATGCATGGTTGCAG
3. Penguin_Paramyxovirus_C	GATGATATCCATTTGCTGCTATCAATCTGGCTGCAGCCCGACCTGGCTGTAAGAGTGGCTTGCATGGTTCCAG

Imagen 6: Secuencias génicas confirmadas de los APMV, mediante MiSeq® System, Illumina®. Las muestras corresponden a los pingüinos 86, 110 y 132. Los fragmentos génicos poseen 70 pb, debido a que se eliminó la fracción de acoplamiento con los partidores.

9.4. Análisis Filogenético

Los tres agentes virales confirmados fueron alineados con las secuencias génicas de los doce paramixovirus aviáres registrados en la actualidad, más dos variantes del que próximamente será reconocido como APMV-13. Los

segmentos génicos correspondientes al acoplamiento de los partidores fueron eliminados de las secuencias finales, por lo que el alineamiento de todos los APMV consideró un fragmento génico de 70 pb de tamaño, que demostró ser bastante variable (ver Anexo 5). El análisis filogenético se desarrolló con *Maximum Likelihood* en la plataforma de Mega6, utilizando el modelo de Tamura-Nei como el método de mejor ajuste para los datos y efectuándolo con *bootstrap* de 1000 (ver Imagen 7).

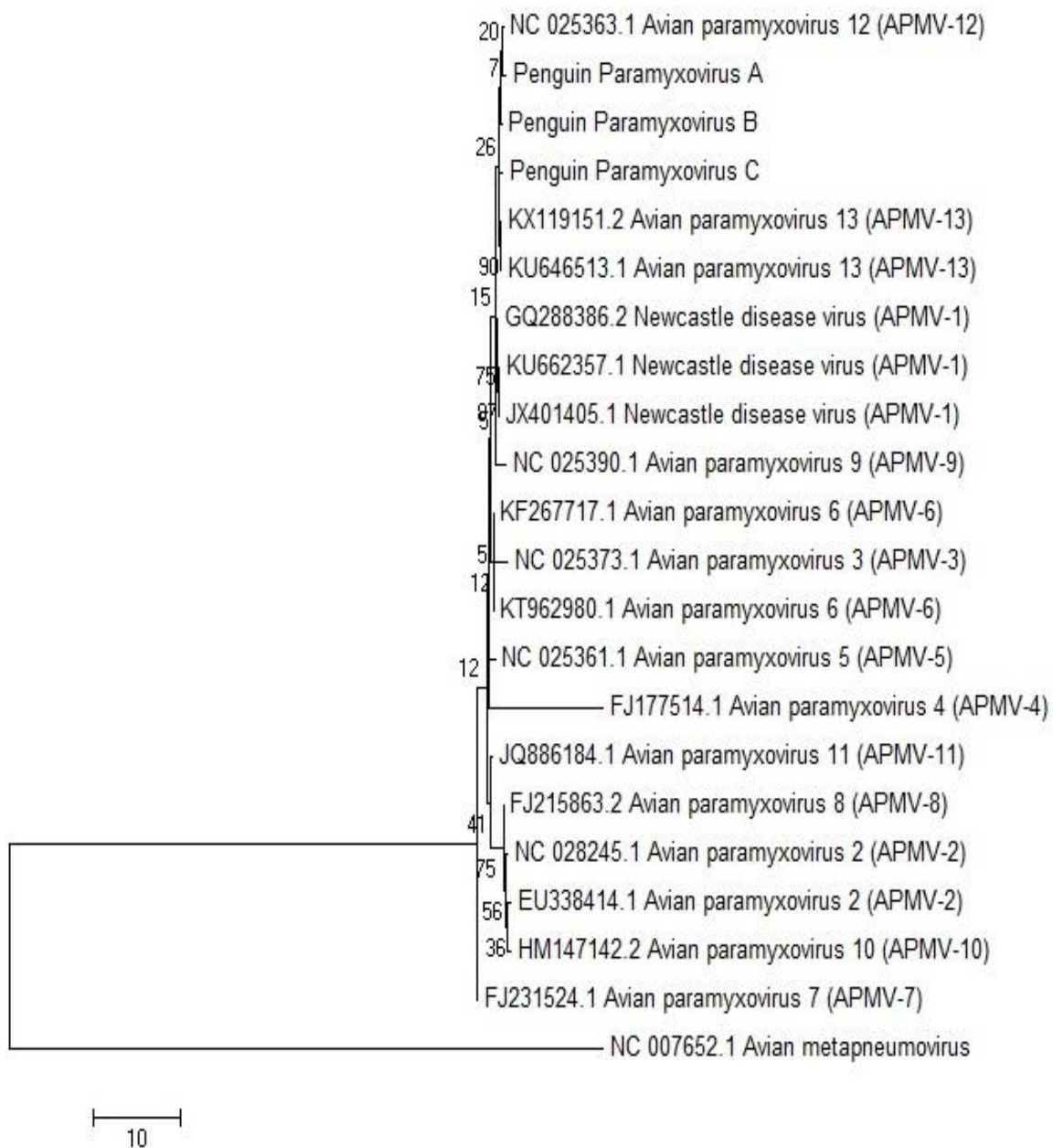


Imagen 7: Árbol filogenético de los APMV detectados en *Pygoscelis papua*. Árbol incluye cepas representantes de las 13 especies de APMV descritas en la actualidad. Árbol desarrollado con *Maximum likelihood*, con modelo de Tamura-Nei y realizado con valor de *bootstap* igual a 1000.

La realización del análisis de *Maximum likelihood* permitió diferenciar los APMV, aunque un alto porcentaje de los clados representados evidenciaron bajos valores de *bootstrap*. En lo que respecta al análisis filogenético, los resultados demuestran que los paramyxovirus aviares obtenidos se relacionan cercanamente con el APMV-1, AMPV-12 y APMV-13. De las tres, las muestras A y B se encuentran localizadas en el mismo *subcluster* con el APMV-12; mientras que la muestra C se ubica en el *subcluster* con el APMV-13.

9.5. Comparaciones Nucleotídicas y Aminoacídicas

Las comparaciones referentes al número de diferencias, entre las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de todos los *Avulavirus* y los paramixovirus aviares descritos en esta investigación, confirman que nuestros aislamientos están estrechamente relacionados entre ellos, pero no son iguales ya que existe similar diferencia entre ellos que la existente con a los APMV-12 y APMV-13 (ver Cuadro 2).

10. DISCUSIÓN

El continente antártico cautiva por su enorme variedad de particularidades, que van desde sus imponentes hielos eternos hasta sus extremas condiciones geográfico - climáticas; pero no podemos dejar de lado a la emblemática fauna que la habita, puesto que ella es igual de enigmática que el ecosistema en que reside. La diversidad de los agentes microbiológicos, así como también las diversas especies animales afectadas por ellos, representan las interrogantes de mayor interés dentro de la comunidad científica, lo que se ha traducido en la realización de vigilancias sanitarias sobre sus poblaciones, especialmente las que constituyen la avifauna. La biomasa de las especies aviares que habitan el Océano Austral, está constituida en aproximadamente un 90% por Spheniciformes (Williams y Rothery, 1990), debido a esto, los pingüinos son el grupo idóneo para la pesquisa de agentes infectocontagiosos en esa área geográfica.

El presente estudio se enfocó en evaluar la existencia de paramixovirus aviares en pingüinos de papúa (*Pygoscelis papua*) antárticos, por medio de la recolección y análisis de 345 muestras cloacales/ambientales, lo que nos permitió detectar cinco ejemplares positivos al RT-PCR empleado como herramienta diagnóstica. De las cinco muestras mencionadas, solo tres lograron ser secuenciadas adecuadamente. Es importante señalar que este es el primer estudio que logra detectar agentes infecciosos en pingüinos de papúa, ya que previamente se habían desarrollado otras, pero sin resultados. Una de estas investigaciones se desarrolló en la península antártica y consideró el análisis de 300 muestras individuales; con las cuales no se determinó evidencia de agentes virales de alto impacto (González-Acuña *et al.*, 2013).

El ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) actualizó recientemente la taxonomía correspondiente a la familia *Paramyxoviridae*

(Afonso *et al.*, 2016), con modificaciones que consideran la ampliación del género *Avulavirus* debido a la introducción de tres nuevas especies de paramixovirus aviáres (APMV), que fueron denominados cronológicamente en base a su descubrimiento como: APMV-10 (Miller *et al.*, 2010), APMV-11 (Briand *et al.*, 2012) y APMV-12 (Terregino *et al.*, 2013). El reconocimiento formal de estos tres agentes virales no sería el último dentro de los *Avulavirus*, ya que se ha notificado el hallazgo de dos nuevos APMV, que serían próximamente aceptados como el APMV-13 (Yamamoto *et al.*, 2015; Karamendin *et al.*, 2016; Goraichuk *et al.*, 2016) y APMV-14 (Thampaisarn *et al.*, 2017) en las actualizaciones taxonómicas venideras. Cabe mencionar, que los cuatro paramixovirus aviáres mencionados fueron detectados en aves silvestres, lo que resulta extremadamente relevante para resaltar la importancia epidemiológica que desempeñan estas aves en la diseminación de los diversos APMV; así como también, para enfatizar la trascendental función que cumplen las vigilancias sanitarias desarrolladas en las diversas poblaciones aviáres a nivel global.

La contextualización geográfico-temporal de las muestras positivas a los APMV arroja información de gran importancia. Los cinco aislamientos positivos al RT-PCR y por consecuencia miembros de la familia *Paramyxoviridae*, corresponden a muestras recolectadas entre los días 28 y 29 de enero de 2014; en Isla Kopaitic, una pequeña localidad ubicada en las cercanías de la Base General Bernardo O'Higgins. En dicha isla, particularmente confluyen colonias reproductivas de los tres pingüinos representantes del género *Pygoscelis*, es decir; el pingüino adelia (*Pygoscelis adeliae*), pingüino barbijo (*Pygoscelis antarctica*) y pingüino papúa (*Pygoscelis papua*). Este antecedente aporta valiosa información, principalmente al considerar que nunca se habían descrito agentes virales circulando en pingüinos de papúa, contrariamente a lo que ocurre con los pingüinos adelia, especialmente en lo que respecta a paramixovirus aviáres (Morgan y Westbury, 1981; Morgan y Westbury, 1988;

Austin y Webster, 1993). El contexto geográfico-temporal en que se obtuvieron las muestras, más la congregación de distintas especies aviares en la zona, permiten sospechar, que a la confirmada presencia APMV en pingüinos papúa, eventualmente los agentes se encontraban extendidos en una mayor proporción dentro de la especie descrita, así como también en los otros pygoscelidos del área. Las repercusiones que podrían tener estos agentes virales sobre el estado sanitario de su avifauna hospedera, al igual que en el resto de los APMV detectados en la Antártica, aún son desconocidas (Woods *et al.*, 2009); así como el rol que desempeñan las aves en la transmisión y diseminación de estos patógenos.

Las secuencias genómicas de los fragmentos de ADN obtenidos por RT-PCR se confirmaron con la secuenciación completa del genoma. El análisis con BLAST exhibió resultados no concluyentes para cada aislamiento viral a nivel de especie viral, pero sí nivel de Género, ya que fue posible identificarlos como avulavirus o paramixovirus aviares. En lo que respecta directamente al análisis filogenético de dichas secuencias, podemos señalar que los tres aislamientos virales confirmados corresponderían a APMV estrechamente relacionados entre sí, y que están relacionados evolutivamente con el APMV-12 y APMV-13. Los bajos valores de *bootstap* indican que nuestro árbol no es una fiel representación de la realidad, lo que estaría principalmente relacionado al pequeño tamaño del segmento génico analizado; no obstante, la filogenia de los genomas completos de nuestros tres aislamientos los reúne también en clados con APMV-12 y APMV-13, confirmando lo realizado previamente con esta técnica. El paramixovirus aviar evolutivamente más cercano a las muestras A y B corresponde al APMV-12, que precisamente es una especie viral descrita y reconocida recientemente, y que fue aislada desde muestras cloacales de silbón europeo (*Anas penelope*) en Italia (Terregino *et al.*, 2013). Por su parte, la muestra C está cercanamente emparentada con el APMV-13, que también es un agente nuevo, descrito a partir de muestras de ánsar careto grande (*Anser*

albifrons) en Kazahistán (Karamendin *et al.*, 2016). Hay que resaltar, que tanto el APMV-12 como el APMV-13 fueron descritos en lugares extremadamente lejanos al de nuestros aislamientos actuales, lo que sugiere la existencia de un flujo genético viral a nivel intercontinental, desconocido en la actualidad para estos agentes virales.

Es imposible dejar de mencionar al agente emblemático de los *Avulavirus*, que corresponde al APMV-1, o virus causal de la enfermedad de Newcastle. Este paramixovirus aviar se ha registrado en todos los continentes, incluyendo la Antártica (Alexander *et al.*, 1989; Thomazelli *et al.*, 2010); sin embargo, el conocimiento asociado a su distribución y a sus cepas circulantes entre las poblaciones aviares aún es muy fragmentado (Leighton y Heckert, 2008). Se considera que las cepas que solamente circulan en una especie aviar podrían llegar a ocasionar la enfermedad en aves de localidades geográficas distantes (Soñora *et al.*, 2015). En base a esto, desconocemos la real distribución y las especies aviares que se ven afectadas por nuestros APMV, por lo que es imprudente estimar aún potenciales impactos a nivel global.

En lo que respecta al RT-PCR utilizado en este estudio, los partidores fueron desarrollados con la finalidad de detectar paramixovirus desconocidos, por esta razón amplifican el gen más conservado dentro de la familia *Paramyxoviridae*, que corresponde al gen L; que codifica para la RNA polimerasa dependiente de RNA (Van Boheemen *et al.*, 2012; Tong *et al.*, 2008). A pesar al pequeño tamaño del producto obtenido por la reacción de RT-PCR, el análisis filogenético de su secuencia nucleotídica permite la identificación de las distintas especies virales pertenecientes a la familia (Van Boheemen *et al.*, 2012).

Así, el análisis filogenético realizado agrupa a los tres virus aislados en clados estrechamente emparentados con el APMV-12, que es un agente descubierto

recientemente y que posee un escaso número de secuencias nucleotídicas disponibles. Sin embargo, los resultados de las diferencias nucleotídicas y aminoacídicas sugieren que alguno de nuestros aislamientos; o todos ellos, corresponderían a un APMV desconocido hasta el momento, puesto que las diferencias nucleotídicas existentes entre ellos es similar a la observada entre los APMV identificados en la actualidad. Ante la eventualidad de que nuestros aislamientos fueran especies virales distintas de las conocidas, evaluamos la capacidad de detección de nuestros partidores frente a paramixovirus caracterizados en los últimos años; para esto consideramos los genomas de tres virus relevantes: morbilivirus felino (Woo *et al.*, 2012), parainfluenza porcino-1 (Lau *et al.*, 2013) y el virus Mojiang (Wu *et al.*, 2014); cuyos códigos de acceso en GenBank son JQ411014, JX857409 y KF278639; respectivamente. Sus genomas fueron analizados en una simulación desarrollada en la plataforma de Mega 6.0, con lo cual logramos determinar que los tres paramixovirus pueden ser detectados teóricamente por nuestro juego de partidores; lo que ayuda a reforzar la idea de que nuestra técnica molecular es exitosa en la identificación de miembros de la familia desconocidos hasta la fecha.

Un aspecto discutible es el tamaño de los productos de RT-PCR obtenidos (70 pb), puesto que a pesar de la efectiva secuenciación de los fragmentos de ADN y su posterior clasificación como paramixovirus aviares; no se logró confirmar la o las especies a la que pertenecían los tres agentes. En una investigación alterna, que se escapa a los objetivos de esta tesis; se evaluó el genoma completo de nuestros agentes y sus resultados indicaron que ellos corresponderían a nuevas especies de APMV. Sin embargo, el análisis filogenético llevado a cabo con las secuencias nucleotídicas del fragmento F completo de los tres virus, exhibió resultados muy parecidos a los de esta tesis, lo que refuerza la utilidad de los partidores descritos por Van Boheemen en la identificación de APMV.

En el contexto de la notificación de nuevos agentes en la fauna antártica, podemos mencionar el hallazgo de adenovirus aviar en págalos antárticos y pingüinos de barbijo (Park *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2014), papilomavirus en pingüino adelia (Varsani *et al.*, 2015) y la descripción de un virus de influenza aviar H11N2 en pingüino adelia (Hurt *et al.*, 2014). También, debemos destacar la aparición de un cuadro semejante al trastorno de pérdida de plumas en polluelos de pingüino adelia (Barbosa *et al.*, 2015). Hay que recordar que las aves desempeñan un rol fundamental en la evolución, emergencia y diseminación de nuevos patógenos, puesto que son reservorios de diversos virus; por esta razón no es casualidad que se encuentren nuevos agentes virales en representantes de la avifauna (Chan *et al.*, 2015). Los antecedentes bibliográficos detallados anteriormente y los resultados obtenidos en esta investigación, refuerzan la necesidad de continuar desarrollando investigaciones en la Antártica.

A modo de resumen, podemos señalar que logramos cumplir con el objetivo de identificar paramixovirus aviares en pingüinos de papúa; especie que anteriormente carecía de información referente a agentes virales; adicionalmente a esto, obtuvimos información filogenética que sugiere que dichos aislamientos podrían corresponder a nuevas especies de APMV. Nuestros hallazgos junto al descubrimiento de diversos paramixovirus aviares reportados en la última década, están cambiando la percepción científica respecto a los *Avulavirus*, puesto que evidencian el desconocimiento de la real diversidad y distribución de dichos agentes en las aves silvestres a nivel global.

11. CONCLUSIÓN

En este proyecto de tesis, se logró aislar e identificar paramixovirus aviares a partir de muestras cloacales de pingüino papúa (*Pygoscelis papua*), provenientes de distintas localidades del territorio antártico chileno.

Los resultados de esta investigación demuestran que existen paramixovirus aviares circulando en las poblaciones silvestres de pingüino de papúa, lo que refuerza la idea de que estos agentes son endémicos en el ecosistema antártico. No obstante, aún existen diversas interrogantes respecto a la forma en que circulan estos agentes, las especies aviares que participan en su dispersión y los potenciales efectos patogénicos que podrían desencadenar estos virus dentro de sus hospederos. Debido a esto, se debe considerar trascendental la integración de dichas temáticas en la formulación de las investigaciones científicas futuras.

12. BIBLIOGRAFÍA

ADAMS, N. J.; KLAGES, N. T. 1989. Marion Island Temporal variation in the diet of the Gentoo Penguin *Pygoscelis papua* at sub-Antarctic Marion Island. *Colon Waterbird*. 12(1):30-36.

AFONSO, C. L.; AMARASINGHE, G. K.; BANYAI, K.; BAO, Y.; BASLER, C. F.; BAVARI, S.; BEJERMAN, N.; BLASDELL, K. R.; BRIAND, F. X.; BRIESE, T.; BUKREYEV, A.; CALISHER, C. H.; CHANDRAN, K.; CHENG, J.; CLAWSON, A. N.; COLLINS, P. L.; DIETZGEN, R. G.; DOLNIK, O.; DOMIER, L. L.; DÜRRWALD, R.; DYE, J. M.; EASTON, A. J.; EBIHARA, H.; FARKAS, S. L.; FREITAS-ASTUAS, J.; FORMENTY, P.; FOUCHIER, R. A. M.; FU, Y.; GHEDIN, E.; GOODIN, M. M.; HEWSON, R.; HORIE, M.; HYNDMAN, T. H.; JIÄNG, D.; KITAJIMA, E. W.; KOBINGER, G. P.; KONDO, H.; KURATH, G.; LAMB, R. A.; LENARDON, S.; LEROY, E. M.; LI, C. X.; LIN, X. D.; LIU, L.; LONGDON, B.; MARTON, S.; MAISNER, A.; MÜHLBERGER, E.; NETESOV, S. V.; NOWOTNY, N.; PATTERSON, J. L.; L. PAYNE, S. L.; PAWESKA, J. T.; RANDALL, R. E.; RIMA, B. K.; ROTA, P.; RUBBENSTROTH, D.; SCHWEMMLE, M.; SHI, M.; SMITHER, S. J.; STENGLEIN, M. D.; STONE, D. M.; TAKADA, A.; TERREGINO, C.; TESH, R. B.; TIAN, J. H.; TOMONAGA, K.; TORDO, N.; TOWNER, J. S.; VASILAKIS, N.; VERBEEK, M.; VOLCHKOV, V. E.; WAHL-JENSEN, V.; WALSH, J. A.; WALKER, P. J.; WANG, D.; WANG, L. F.; WETZEL, T.; WHITFIELD, A. E.; XIE, J.; YUEN, K. Y.; ZHANG, Y. Z.; KUHN, J. H. 2016. Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2016. *Arch Virol*. 161:2351–2360.

ALEXANDER, D. J. 1988. Newcastle Disease: Methods of Spread. In: Alexander, D.J. Newcastle Disease. Springer. New York, USA. 378 p.

ALEXANDER, D. J. 2000. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Rev Off Int Epizoot*. 19(2):443-462.

ALEXANDER, D. J. 2011. Newcastle disease in the European Union 2000 to 2009. *Avian Pathol*. 40(6):547-558.

ALEXANDER, D. J.; MANVELL, R. J.; COLLINS, M. S.; BROCKMAN, S. J.; WESTBURY, H. A.; MORGAN, I.; AUSTIN, F. J. 1989. Characterization of paramyxoviruses isolated from penguins in Antarctica and sub-Antarctica during 1976-1979. *Arch Virol*. 109:135-143.

AUSTIN, F. J.; WEBSTER, R. G. 1993. Evidence of ortho- and paramyxoviruses in fauna from Antarctica. *J Wildl Dis*. 29(4):568-571.

- BALISH, A. L.; KATZ, J. M.; KLIMOV, A. I.** 2013. Influenza: Propagation, Quantification, and Storage. *Curr Protoc Microbio.* 29:G:15G.1:15G.1.1–15G.1.24.
- BARBOSA, A.; COLOMINAS-CIURO, R.; CORIA, N.; CENTURION, M.; SANDLER, R.; NEGRI, A.; SANTOS, M.** 2015. First record of feather-loss disorder in Antarctic penguins. *Antarct Sci.* 27(1):69–70
- BAUMEISTER, E.; LEOTTA, G.; PONTORIERO, A.; CAMPOS, A.; MONTALTI, D.; VIGO, G.; PECORARO, M.; SAVY, V.** 2004. Serological evidences of influenza A virus infection in Antarctica migratory birds. *Int Congr Ser.* 1263:737-740.
- BOST, C.A.; JOUVENTIN, P.** 1990. Evolutionary Ecology of Gentoo Penguins (*Pygoscelis papua*). *In:* Davis, L.S.; Darby, J.T. *Penguin Biology.* Elsevier. San Diego, USA. 467 p.
- BOST, C. A.; JOUVENTIN, P.** 1991. The breeding performance of the Gentoo Penguin *Pygoscelis pupua* at the northern edge of its range. *Ibis.* 133:14-25
- BRIAND, F. X.; HENRY, A.; MASSIN, P.; JESTIN, V.** 2012. Complete Genome Sequence of a Novel Avian Paramyxovirus. *J Virol.* 86(14):7710
- CHAN, J. F. W.; TO, K. K. W.; CHEN, H.; YUEN, K. Y.** 2015. Cross-species transmission and emergence of novel viruses from birds. [en línea]. *Curr Opin Virol.* 10:63–69. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1879625715000073> >. [consulta: 07-09-2016]
- CROXALL, J. P.; PRINCE, P. A.** 1980. The food of Gentoo Penguins *Pygoscelis papua* and Macaroni Penguins *Eudyptes chrysolophus* at South Georgia. *Ibis.* 122:245-253.
- DAVIS-FIELDS, M. K.; ALLISON, A. B.; BROWN, J. R.; POULSON, R. L.; STALLKNECHT, D. E.** 2014. Effects of Temperature and pH on the Persistence of Avian Paramyxovirus-1 in Water. *J Wildl Dis.* 50(4):998-1000.
- DAVIS, L. S.; RENNER, M.** 2003. *The Penguins.* Yale University Press. Londres, Inglaterra. 224 p.
- DUNDON, W.G.** 2009. Biosafety Procedures. *In:* Capua, I.; Alexander, D. J. *Avian Influenza and Newcastle Disease, A Field and Laboratory Manual.* Springer. Milan, Italia. 190 p.

GOEBEL, S. J.; TAYLOR, J.; BARR, B. C.; KIEHN, T. E.; CASTRO-MALASPINA, H. R.; HEDVAT, C. V.; RUSH-WILSON, K. A.; KELLY, C. D.; DAVIS, S. W.; SAMSONOFF, W. A.; HURST, K. R.; BEHR, M. J.; MASTERS, P. S. 2007. Isolation of Avian Paramyxovirus 1 from a Patient with a Lethal Case of Pneumonia. *J Virol.* 81(22):12709–12714.

GOGOI, P.; GANAR, K.; KUMAR, S. 2015. Avian Paramyxovirus: A Brief Review. [en línea]. *Transbound Emerg Dis.* <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/tbed.12355/epdf>>. [consulta: 21-01-2016].

GONZALEZ-ACUÑA, D.; HERNANDEZ, J.; MORENO, L.; HERRMANN, B.; PALMA, R.; LATORRE, A.; MEDINA-VOGEL, G.; KINSELLA, M. J.; MARTIN, N.; ARAYA, K.; TORRES, I.; FERNANDEZ, N.; OLSEN, B. 2013. Health evaluation of wild gentoo penguins (*Pygoscelis papua*) in the Antarctic Peninsula. *Polar Biol.* 36:1749-1760.

GORAICHUK, I.; SHARMA, P.; STEGNIY, B.; MUZYKA, D.; PANTIN-JACKWOOD, M. J.; GERILOVYCH, A.; SOLODIANKIN, O.; BOLOTIN, V.; MILLER, P. J.; DIMITROV, K. M.; AFONSO, C. L. Complete Genome Sequence of an Avian Paramyxovirus Representative of Putative New Serotype 13. [en línea]. *Genome Announc.* 4(4):e00729-16. <<http://genomea.asm.org/content/4/4/e00729-16.full.pdf+html>>. [consulta: 04-10-2016]

GRIEKSPoor, P.; OLSEN, B.; WALDENSTRÖM, J. 2009. *Campylobacter jejuni* in Penguins, Antarctica. *Emerg Infect Dis.* 15(5):847-849.

GRIMALDI, W. W.; SEDDON, P. J.; LYVER, P. O'B.; NAKAGAWA, S.; TOMPKINS, D. M. 2014. Infectious diseases of Antarctic penguins: current status and future threats. *Polar Biol.* 38(5):591-606.

HINES, N. L.; MILLER, C. L. 2012. Avian Paramyxovirus Serotype-1: A Review of Disease. *Vet Med Int.* [en línea]. <<http://www.hindawi.com/journals/vmi/2012/708216/>>. [consulta: 03-01-2016].

HURT, A. C.; VIJAYKRISHNA, D.; BUTLER, J.; BAAS, C.; MAURER-STROH, S.; SILVA-DE-LA-FUENTE, M. C.; MEDINA-VOGEL, G.; OLSEN, B.; KELSO, A.; BARR, I. G.; GONZALEZ-ACUÑA, D. 2014. Detection of Evolutionarily Distinct Avian Influenza A Viruses in Antarctica. [en línea]. *mBio.* 5(3). <<http://mbio.asm.org/content/5/3/e01098-14.full.pdf+html>>. [consulta: 26-03-2016]

ICTV (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES). 2017. Virus Taxonomy. [en línea]. <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>>. [consulta:20-05-2016]

IUCN (INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE). 2015. *Pygoscelis papua* (Gentoo Penguin). [en línea]. <<http://www.iucnredlist.org/details/22697755/0>>. [consulta: 20-12-2015]

KALETA, E. F.; BALDAUF, C. 1988. Newcastle disease in free-living and pet birds. **In:** Alexander, D.J. Newcastle Disease. Springer. 378 p.

KARAMENDIN, K.; KYDYRMANOV, A.; SEIDALINA, A.; ASANOVA, S.; SAYATOV, M.; KASYMBEKOV, E.; KHAN, E.; DAULBAYEVA, K.; HARRISON, S. M.; CARR, I. M.; GOODMAN, S. J.; ZHUMATOV, K. 2016. Complete Genome Sequence of a Novel Avian Paramyxovirus (APMV- 13) Isolated from a Wild Bird in Kazakhstan. [en línea]. Genome Announc. 4(3):e00167-16. < <http://genomea.asm.org/content/4/3/e00167-16.full.pdf+html>>. [consulta: 04-10-2016]

KERRY, K.; RIDDLE, M.; CLARKE, J. 1998. Diseases of Antarctic Wildlife. **In:** Workshop on Diseases of Antarctic Wildlife. Hobart, Australia. 25-28 Agosto 1998. Australian Antarctic Division. [en línea].

<http://www.ats.aq/documents/SATCM12/att/SATCM12_att002_e.pdf>
[consulta: 23-01-2016]

LAU, S. K. P.; WOO, P. C. Y.; WU, Y.; WONG, A. Y. P.; WONG, B. H. L.; LAU, C. C. Y.; FAN, R. Y. Y.; CAI, J. P.; TSOI, H. W.; CHAN, K. H.; YUEN, K. Y. 2013. Identification and characterization of a novel paramyxovirus, porcine parainfluenza virus 1, from deceased pigs. J Gen Virol. 94:2184-2190.

LEE, S. Y.; KIM, J. H.; PARK, Y. M.; SHIN, O. S.; KIM, H.; CHOI, H. G.; SONG, J. W. 2014. A Novel Adenovirus in Chinstrap Penguins (*Pygoscelis antarctica*) in Antarctica. Viruses. 6:2052-2061. [en línea]. <<http://www.mdpi.com/1999-4915/6/5/2052/htm>>. [consulta: 14-03-2016]

LEEuw, O.; PEETERS, B. 1999. Complete nucleotide sequence of Newcastle disease virus: evidence for the existence of a new genus within the subfamily Paramyxovirinae. J Gen Virol. 80:131-136.

LEIGHTON, F. A.; HECKERT, R. A. 2008 Newcastle Disease and Related Avian Paramyxoviruses. **In:** Thomas, N.J.; Hunter, D.B.; Atkinson, C.T. Infectious Diseases of Wild Birds. Blackwell. 496 p.

LEOTTA, G. A.; CHINEN, I.; VIGO, G. B.; PECORARO, M.; RIVAS, M. 2006. Outbreaks of avian cholera in Hope Bay, Antarctica. J Wildl Dis. 42(2):259-270.

- LEOTTA, G. A.; RIVAS, M.; CHINEN, I.; VIGO, G. B.; MOREDO, F. A.; CORIA, N.; WOLCOTT, M. J.** 2003. Avian Cholera in a Southern Giant Petrel (*Macronectes giganteus*) from Antarctica. *J Wildl Dis.* 39(3):732-735.
- LEOTTA, G.; VIGO, G.; GIACOBONI, G.** 2006. Isolation of *Campylobacter lari* from seabirds in Hope Bay, Antarctica. *Pol Polar Res.* 27(4):303-308.
- LESCROËL, A.; RIDOUX, V.; BOST, C. A.** 2004. Spatial and temporal variation in the diet of the gentoo penguin (*Pygoscelis papua*) at Kerguelen Islands. *Polar Biol.* 27:206-216.
- LYNCH, H. J.** 2013. Gentoo Penguin (*Pygoscelis papua*). **In:** García-Borboroglu, P.; Boersma, P. D. *Penguins: Natural History and Conservation.* University of Washington Press. 360 p.
- LYNCH, H. J.; NAVEEN, R.; TRATHAN, P. N.; FAGAN, W. F.** 2012. Spatially integrated assessment reveals widespread changes in penguin populations on the Antarctic Peninsula. *Ecology.* 93(6):1367-1377.
- MCGINNES, L. W.; PANTUA, H.; REITTER, J.; MORRISON, T. G.** 2006. Newcastle Disease Virus: Propagation, Quantification, and Storage. *Curr Protoc Microbio.* 1:F:15F.2:15F.2.1–15F.2.18
- MILLER, P. J.; AFONSO, C. L.; SPACKMAN, E.; SCOTT, M. A.; PEDERSEN, J. C.; SENNE, D. A.; BROWN, J. D.; FULLER, C. M.; UHART, M. M.; KARESH, W. B.; BROWN, I. H.; ALEXANDER, D. J.; SWAYNE, D. E.** 2010. Evidence for a New Avian Paramyxovirus Serotype 10 Detected in Rockhopper Penguins from the Falkland Islands. *J Virol.* 84(21):11496-11504.
- MILLER, G. D.; WATTS, J. M.; SHELLAM, G. R.** 2008. Viral antibodies in south polar skuas around Davis Station, Antarctica. *Antarct Sci.* 20(5):455-461.
- MORGAN, I. R.; WESTBURY, H. A.** 1981. Virological Studies of Adelie Penguins (*Pygoscelis adeliae*) in Antarctica. *Avian Dis.* 25(4):1019-1026.
- MORGAN, I. R.; WESTBURY, H. A.** 1988. Studies of viruses in penguins in the Vestfold Hills. *Hydrobiologia.* 165:263-269.
- OELKE, H.; STEINIGER, F.** 1973. Salmonella in Adélie Penguins (*Pygoscelis adeliae*) and South Polar Skuas (*Catharacta maccormicki*) on Ross Island, Antarctica. *Avian Dis.* 17(3):568-573.
- OIE (WORLD ORGANIZATION OF ANIMAL HEALTH).** 2012. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals.* 7th ed. 1404 p.

OLSEN, B.; MUNSTER, V. J.; WALLENSTEN, A.; WALDENSTRÖM, J.; OSTERHAUS, A. D. M. E.; FOUCHIER, R. A. M. 2006. Global Patterns of Influenza a Virus in Wild Birds. *Science*. 312(5772): 384–388.

PALMGREN, H.; MCCAFFERTY, D.; ASPAN, A.; BROMAN, T.; SELLIN, M.; WOLLIN, R.; BERGSTRÖM, S.; OLSEN, B. 2000. Salmonella in sub-Antarctica: low heterogeneity in salmonella serotypes in South Georgian seals and birds. *Epidemiol Infect.* 125(2):257-262.

PANDA, A.; HUANG, Z.; ELANKUMARAN, S.; ROCKEMANN, D. D.; SAMAL, S. K. 2004. Role of fusion protein cleavage site in the virulence of Newcastle disease virus. *Microb Pathogenesis*. 36:1-10.

PARK, Y. M.; KIM, J. H.; GU, S. H.; LEE, S. Y.; LEE, M. G.; KANG, Y. K.; KANG, S. H.; KIM, H. J.; SONG, J. W. 2012. Full genome analysis of a novel adenovirus from the South Polar skua (*Catharacta maccormicki*) in Antarctica. *Virology* 422: 144–150.

PEARCE, D. A.; WILSON, W. H. 2003. Viruses in Antarctic ecosystems. *Antarct Sci.* 15(3):319-331.

PEÑA, F.; POULIN, E.; DANTAS, G. P.; GONZALEZ-ACUÑA, D.; PETRY, M. V.; VIANNA, J. A. 2014. Have Historical Climate Changes Affected Gentoo Penguin (*Pygoscelis papua*) Populations in Antarctica?. [en línea]. PLoS ONE 9(4). <
http://www.iebchile.cl/uploads/publicaciones/1_Pe%C3%B1a_et al 2014_PlosOne.pdf>. [consulta: 13-01-2016].

PIERSON, G. P.; PLOW, C. J. 1975. Newcastle disease surveillance in the United States. *J Am Vet Med Assoc.* 167(9):801-803. (citado por Woods, R.; Jones, H. I.; Watts, J.; Miller, G. D.; Shellam, G. R. *Diseases of Antarctic Seabirds*. In: Kerry, K.R.; Riddle, M.J. *Health of Antarctic Wildlife: A Challenge for Science and Policy*. Springer. Berlín, Alemania. 490 p.

ROBINSON, S. A.; HINDELL, M. A. 1996. Foraging ecology of Gentoo Penguins *Pygoscelis pupua* at Macquarie Island during the period of chick care. *Ibis*. 138:722-731.

SAG (SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO). 2015. Ficha Técnica Enfermedad de Newcastle. [en línea]. <http://www.sag.gob.cl/sites/default/files/enfermedad_Newcastle.pdf> [consulta: 15-10-2015]

SAMAL, S. K. 2011. Newcastle Disease and Related Avian Paramyxoviruses. In: Samal, S. K. *The biology of Paramyxoviruses*. Caister Academic Press Norfolk, Inglaterra. 480 p.

SAMSON, A. C. R. 1988. Virus Structure. In: Alexander, D.J. Newcastle Disease. Springer. New York, USA. 378 p.

SCHEID, A.; CHOPPIN, P.W. 1974. Identification of biological activities of paramyxovirus glycoproteins. Activation of cell fusion, hemolysis, and infectivity by proteolytic cleavage of an inactive protein of Sendai virus. *Virology*. 57:470–90.

SOÑORA, M.; MORENO, P.; ECHEVERRIA, N.; FISCHER, S.; COMAS, V.; FAJARDO, A.; CRISTINA, J. 2015. An evolutionary insight into Newcastle disease virus isolated in Antarctica. *Arch Virol*. 160 (8):1893-1900.

SPACKMAN, E.; KILLIAN, M.L. 2014. Avian Influenza Virus Isolation, Propagation and Titration in Embryonated Chicken Eggs. In: Spackman, E. Animal Influenza Virus. Humana Press. New York, USA. 425 p.

STONEHOUSE, B. 1970. Geographic variation in Gentoo Penguins *Pygoscelis papua*. *Ibis*. 112:52-57.

SWAYNE, D. E.; KING, D. J. 2003. Avian influenza and Newcastle disease. *JAVMA*. 222 (11):1534–1540.

TERREGINO, C.; ALDOUS, E. W.; HEIDARI, A.; FULLER, C. M.; DE NARDI, R.; MANVELL, R. J.; BEATO, M. S.; SHELL, W. M.; MONNE, I.; BROWN, I. H.; ALEXANDER, D. J.; CAPUA, I. 2013. Antigenic and genetic analyses of isolate APMV/wigeon/Italy/ 3920-1/2005 indicate that it represents a new avian paramyxovirus (APMV-12). *Arch Virol*. 158: 2233. doi:10.1007/s00705-013-1735-2

TERREGINO, C.; CAPUA, I. 2009. Conventional Diagnosis of Avian Influenza. In: Capua, I.; Alexander, D.I. Avian Influenza and Newcastle Disease: A Field and Laboratory Manual. Springer. Milan, Italia. 190 p.

THAMPAISARN, R.; BUI, V. N.; TRINH, D. Q.; NAGAI, M.; MIZUTANI, T.; OMATSU, T.; KATAYAMA, Y.; GRONSANG, D.; LE, D. H. T.; OGAWA, H.; IMAI, K. 2017. Characterization of avian paramyxovirus serotype 14, a novel serotype, isolated from a duck fecal sample in Japan. *Virus Res*. 228:46-57. [en línea]. <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168170216305615>>. [consulta: 03-12-2016]

THOMAZELLI, L. M.; ARAUJO, J.; OLIVEIRA, D. B.; SANFILIPPO, L.; FERREIRA, C. S.; BRENTANO, L.; PELIZARI, V. H.; NAKAYAMA, C.; DUARTE, R.; HURTADO, R.; BRANCO, J. O.; WALKER, D.; DURIGON, E. L. 2010. Newcastle disease virus in penguins from King George Island on the Antarctic region. *Vet Microbiol*. 146:155-160.

TONG, S.; CHERN, S. W. W.; LI, Y.; PALLANSCH, M. A.; ANDERSON, L. J. 2008. Sensitive and broadly reactive reverse transcription-PCR assays to detect novel paramyxoviruses. *J Clin Microbiol.* 46(8):2652-2658.

TRATHAN, P. N.; GARCIA-BORBOROGLU, P.; BOERSMA, D.; BOST, C. A.; CRAWFORD, R. J. M.; CROSSIN, G. T.; CUTHBERT, R. J.; DANN, P.; DAVIS, L. S.; DE LA PUENTE, S.; ELLENBERG, U.; LYNCH, H. J.; MATTERN, T.; PÜTZ, K.; SEDDON, P. J.; TRIVELPIECE, W.; WIENECKE, B. 2014. Pollution, habitat loss, fishing, and climate change as critical threats to penguins. *Conserv Biol.* 29(1):31-41.

VAN BOHEEMEN, S.; BESTEBROER, T. M.; VERHAGEN, J. H.; OSTERHAUS, A. D. M. E.; PAS, S. D.; HERFST, S.; FOUCHIER, R. A. M. 2012. A Family-Wide RT-PCR Assay for Detection of Paramyxoviruses and Application to a Large-Scale Surveillance Study. [en línea]. *PLoS ONE.* 7(4). <<http://journals.plos.org/plosone/article/file?id=10.1371/journal.pone.0034961&type=printable>>. [consulta:23-07-2015].

VARSANI, A.; PORZIG, E. L.; JENNINGS, S.; KRABERGER, S.; FARKAS, K.; JULIAN, L.; MASSARO, M.; BALLARD, G.; AINLEY, D. G. 2015. Identification of an avian polyomavirus associated with Adelie penguins (*Pygoscelis adeliae*). *J Gen Virol.* 96:851–857.

WALLENSTEN, A.; MUNSTER, V. J.; OSTERHAUS, A. D. M. E.; WALDENSTRÖM, J.; BONNEDAHL, J.; BROMAN, T.; FOUCHIER, R. A. M.; OLSEN, B. 2006. Mounting evidence for the presence of influenza A virus in the avifauna of the Antarctic region. *Antarct Sci.* 18(3):353-356.

WILLIAMS, T. D.; ROTHERY, P. 1990. Factors affecting variation in foraging and activity patterns of gentoo penguins (*Pygoscelis papua*) during the breeding season at bird island, South Georgia. *J Appl Ecol.* 27:1042-1054.

WILSON, R. P. 1997. A method for restraining penguins. *Mar Ornithol.* 25:72-73.

WOEHLER, E. J. 1993. The distribution and abundance of Antarctic and Subantarctic penguins. Scientific Committee on Antarctic Research, Cambridge. **In:** García-Borboroglu, P.; Boersma, P. D. 2013. Penguins: Natural History and Conservation. University of Washington Press. 73-88 pp.

WOO, P. C. Y.; LAU, S. K. P.; WONG, B. H. L.; FAN, R. Y. Y.; WONG, A. Y. P.; ZHANG, A. J. X.; WU, Y.; CHOI, G. K. Y.; LI, K. S. M.; HUI, J.; WANG, M.; ZHENG, B. J.; CHAN, K. H.; YUEN, K. Y. 2012. Feline morbillivirus, a previously undescribed paramyxovirus associated with tubulointerstitial nephritis in domestic cats. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109(14):5435-5440.

WOODS, R.; JONES, H.I.; WATTS, J.; MILLER, G.D; SHELLAM, G.R. 2009. Diseases of Antarctic Seabirds. In: Kerry, K.R.; Riddle, M.J. Health of Antarctic Wildlife: A Challenge for Science and Policy. Springer. Berlín, Alemania. 490 p.

WU, Z.; YAN, L.; YANG, F.; REN, X.; JIANG, J.; DONG, J.; SUN, L.; ZHU, Y.; ZHOU, H.; JIN, Q. 2014. Novel Henipa-like Virus, Mojiang Paramyxovirus, in Rats, China, 2012. Emerg Infect Dis. 20(6):1064-166.

WWF (WORLD WILDLIFE FUND). 2016. Antarctica. [en línea]. <<http://www.worldwildlife.org/tours/antarctica>>. [consulta: 10-03-2016]

YAMAMOTO, E.; ITO, H.; TOMIOKA, Y.; ITO, T. 2015. Characterization of novel avian paramyxovirus strain APMV/Shimane67 isolated from migratory wild geese in Japan. J Vet Med Sci. 77(9):1079–1085.

ZOHARI, S.; MUNIR, M. 2013. Avian Paramyxoviruses Serotype 1 to 10. In: Munir, M. Mononegaviruses of Veterinary Importance: Pathobiology and molecular diagnosis. CAB International. 376 p.

13. ANEXOS

POOL	1° PASAJE HE	2° PASAJE HE	INDIVIDUALIZACIÓN DE MUESTRAS		
	Hemoaglutinación	Hemoaglutinación	Muestra	HA	Título hemoaglutinante
1	NEGATIVO	NEGATIVO	2		
			3		
			4		
			5		
2	NEGATIVO	NEGATIVO	6		
			7		
			8		
			9		
3	NEGATIVO	NEGATIVO	10		
			11		
			12		
			13		
4	NEGATIVO	NEGATIVO	14		
			15		
			16		
			17		
5	NEGATIVO	NEGATIVO	18		
			19		
			20		
			21		
6	NEGATIVO	NEGATIVO	22		
			23		
			24		
			25		
7	NEGATIVO	NEGATIVO	26		
			27		
			28		
			29		
8	NEGATIVO	NEGATIVO	30		
			31		
			32		
			33		
			34		
			35		
			36		
			37		
			38		
			39		
			40		

POOL	1° PASAJE HE	2° PASAJE HE	INDIVIDUALIZACIÓN DE MUESTRAS		
	Hemoaglutinación	Hemoaglutinación	Muestra	HA	Título hemoaglutinante
9	NEGATIVO	NEGATIVO	41		
			42		
			43		
			44		
			45		
10	POSITIVO	NO REALIZADO	46		
			47	+	A(1/8) B(1/16)
			48		
			49		
			50		
11	NEGATIVO	NEGATIVO	51		
			52		
			53		
			54		
			55		
12	NEGATIVO	NEGATIVO	56		
			57		
			58		
			59		
			60		
13	NEGATIVO	NEGATIVO	61		
			62		
			63		
			64		
			65		
14	NEGATIVO	POSITIVO	66	+	B(1/2)
			67		
			68		
			69		
			70		
15	NEGATIVO	NEGATIVO	71		
			72		
			73		
			74		
			75		
16	NEGATIVO	NEGATIVO	76		
			77		
			78		
			79		
			80		

POOL	1° PASAJE HE	2° PASAJE HE	INDIVIDUALIZACIÓN DE MUESTRAS		
	Hemoaglutinación	Hemoaglutinación	Muestra	HA	Título hemoaglutinante
17	POSITIVO	NO REALIZADO	81		
			82		
			83		
			84	+	A(1/32) B(1/2)
			85		
18	POSITIVO	NO REALIZADO	86	+	A(1/16) B(1/16)
			87		
			88	+	A(1/4) B(1/128)
			89		
			90		
19	NEGATIVO	NEGATIVO	91		
			92		
			93		
			94		
			95		
20	NEGATIVO	NEGATIVO	96		
			97		
			98		
			99		
			100		
21	POSITIVO	NO REALIZADO	101		
			102		
			103		
			104	+	A(1/16) B(1/32)
			105		
22	NEGATIVO	POSITIVO	106		
			107		
			108		
			109		
			110	+	A(1/64) B(1/64)
23	NEGATIVO	NEGATIVO	111		
			112		
			113		
			114		
			115		
24	POSITIVO	NO REALIZADO	116	+	B(1/4)
			117	+	A(1/4) B(1/16)
			118		
			119		
			120		

POOL	1° PASAJE HE	2° PASAJE HE	INDIVIDUALIZACIÓN DE MUESTRAS		
	Hemoaglutinación	Hemoaglutinación	Muestra	HA	Título hemoaglutinante
25	POSITIVO	NO REALIZADO	121		
			122		
			123		
			124	+	A(1/16) B(1/64)
			125		
26	POSITIVO	NO REALIZADO	126	+	A(1/4) B(1/4)
			127		
			128		
			129		
			130		
27	POSITIVO	NO REALIZADO	131		
			132	+	A(1/32) B(1/32)
			133		
28	NEGATIVO	NEGATIVO	164		
			165		
			166		
			167		
			168		
29	NEGATIVO	NEGATIVO	169		
			170		
			171		
			172		
			173		
30	NEGATIVO	NEGATIVO	174		
			175		
			176		
			177		
			178		
31	NEGATIVO	NEGATIVO	179		
			180		
			181		
			182		
			183		
32	NEGATIVO	NEGATIVO	184		
			185		
			186		
			187		
			188		
33	NEGATIVO	NEGATIVO	189		
			190		
			191		
			192		

POOL	1° PASAJE HE	2° PASAJE HE	INDIVIDUALIZACIÓN DE MUESTRAS		
	Hemoaglutinación	Hemoaglutinación	Muestra	HA	Título hemoaglutinante
34	NEGATIVO	NEGATIVO	193		
			194		
			195		
			196		
			197		
35	NEGATIVO	NEGATIVO	198		
			199		
			200		
			201		
36	NEGATIVO	NEGATIVO	202		
			203		
			204		
			205		
			206		
37	NEGATIVO	NEGATIVO	207		
			208		
			209		
			210		
			211		
38	NEGATIVO	NEGATIVO	212		
			213		
			214		
			215		
			216		
39	NEGATIVO	NEGATIVO	217		
			218		
			219		
			220		
40	NEGATIVO	NEGATIVO	221		
			222		
			223		
			224		
			225		
41	NEGATIVO	NEGATIVO	226		
			227		
			228		
			229		
			230		
			231		
			232		

POOL	1° PASAJE HE	2° PASAJE HE	INDIVIDUALIZACIÓN DE MUESTRAS		
	Hemoaglutinación	Hemoaglutinación	Muestra	HA	Título hemoaglutinante
42	NEGATIVO	NEGATIVO	233		
			234		
			235		
			236		
			237		
43	NEGATIVO	NEGATIVO	238		
			239		
			240		
			241		
			242		
44	NEGATIVO	NEGATIVO	243		
			244		
			245		
			246		
			247		
45	NEGATIVO	NEGATIVO	248		
			249		
			250		
			251		
			252		
46	NEGATIVO	NEGATIVO	253		
			254		
			255		
			256		
			257		
47	NEGATIVO	NEGATIVO	258		
			259		
			260		
			261		
			262		
48	NEGATIVO	NEGATIVO	263		
			264		
			265		
			266		
			267		
49	NEGATIVO	NEGATIVO	268		
			269		
			270		
			271		
			272		

POOL	1° PASAJE HE	2° PASAJE HE	INDIVIDUALIZACIÓN DE MUESTRAS		
	Hemoaglutinación	Hemoaglutinación	Muestra	HA	Título hemoaglutinante
50	NEGATIVO	NEGATIVO	273		
			274		
			275		
			276		
			277		
51	NEGATIVO	NEGATIVO	278		
			279		
			280		
			281		
			282		
52	NEGATIVO	NEGATIVO	283		
			284		
			285		
			286		
			287		
53	NEGATIVO	NEGATIVO	288		
			289		
			290		
54	NEGATIVO	NEGATIVO	291		
			292		
			293		

Anexo 1: Esquematización que representa los antecedentes de la conformación de los *Pools* del año 2014, tales como: Muestras que lo constituyen, Pruebas de hemoaglutinación (HA) posterior al primer y segundo pasaje en huevos embrionados e individualización de la muestra hemoaglutinante dentro del grupo, con su respectivo título hemoaglutinante. Las letras A y B simbolizan a los huevos inoculados por duplicado.

Procedencia	Muestra	1° PASAJE CULTIVO	2° PASAJE CULTIVO	HA
		HA	HA	
Dorian Bay	42	POSITIVO	NO REALIZADO	A(1/4)
	43	NEGATIVO	NEGATIVO	
	44	NEGATIVO	NEGATIVO	
	45	NEGATIVO	NEGATIVO	
	46	NEGATIVO	NEGATIVO	
	47	NEGATIVO	NEGATIVO	
	48	NEGATIVO	NEGATIVO	
	49	NEGATIVO	NEGATIVO	
	50	NEGATIVO	NEGATIVO	
	51	NEGATIVO	NEGATIVO	
	52	NEGATIVO	NEGATIVO	
	53	NEGATIVO	NEGATIVO	
	54	NEGATIVO	NEGATIVO	
	55	NEGATIVO	NEGATIVO	
	56	NEGATIVO	NEGATIVO	
	57	NEGATIVO	NEGATIVO	
	58	NEGATIVO	NEGATIVO	
	59	NEGATIVO	NEGATIVO	
	60	NEGATIVO	NEGATIVO	
	61	NEGATIVO	NEGATIVO	
	62	NEGATIVO	NEGATIVO	
63	NEGATIVO	NEGATIVO		
Base Brown	108	NEGATIVO	NEGATIVO	
	109	NEGATIVO	NEGATIVO	
	110	NEGATIVO	NEGATIVO	
	111	NEGATIVO	NEGATIVO	
	112	NEGATIVO	NEGATIVO	
	113	NEGATIVO	NEGATIVO	
	114	NEGATIVO	NEGATIVO	
	115	NEGATIVO	NEGATIVO	
	116	NEGATIVO	NEGATIVO	
	117	NEGATIVO	NEGATIVO	
	118	NEGATIVO	NEGATIVO	
	119	NEGATIVO	NEGATIVO	
120	NEGATIVO	NEGATIVO		
121	NEGATIVO	NEGATIVO		
122	NEGATIVO	NEGATIVO		
123	NEGATIVO	NEGATIVO		
124	NEGATIVO	NEGATIVO		

Procedencia	Muestra	1° PASAJE CULTIVO	2° PASAJE CULTIVO	Título
		HA	HA	
Pleneau Island	64	NEGATIVO	NEGATIVO	
	65	NEGATIVO	NEGATIVO	
	66	NEGATIVO	NEGATIVO	
	67	NEGATIVO	NEGATIVO	
	68	NEGATIVO	NEGATIVO	
	69	NEGATIVO	NEGATIVO	
	70	NEGATIVO	NEGATIVO	
	71	NEGATIVO	NEGATIVO	
	72	NEGATIVO	NEGATIVO	
	73	NEGATIVO	NEGATIVO	
	74	NEGATIVO	NEGATIVO	
	75	NEGATIVO	NEGATIVO	
	76	NEGATIVO	NEGATIVO	
	77	NEGATIVO	NEGATIVO	
	78	NEGATIVO	NEGATIVO	
	79	NEGATIVO	NEGATIVO	
	80	NEGATIVO	NEGATIVO	
	81	NEGATIVO	NEGATIVO	
	82	NEGATIVO	NEGATIVO	
	83	NEGATIVO	NEGATIVO	
	84	NEGATIVO	NEGATIVO	
	85	NEGATIVO	NEGATIVO	
	86	NEGATIVO	NEGATIVO	
	87	NEGATIVO	NEGATIVO	
	88	NEGATIVO	NEGATIVO	
	89	NEGATIVO	NEGATIVO	
	90	NEGATIVO	NEGATIVO	
	91	NEGATIVO	NEGATIVO	
	92	NEGATIVO	NEGATIVO	
	93	NEGATIVO	NEGATIVO	
	94	NEGATIVO	NEGATIVO	
	95	NEGATIVO	NEGATIVO	
	96	NEGATIVO	NEGATIVO	
	97	NEGATIVO	NEGATIVO	
	98	NEGATIVO	NEGATIVO	
	99	NEGATIVO	NEGATIVO	
	100	NEGATIVO	NEGATIVO	
	101	NEGATIVO	NEGATIVO	
	102	NEGATIVO	NEGATIVO	
	103	NEGATIVO	NEGATIVO	
	104	NEGATIVO	NEGATIVO	
	105	NEGATIVO	NEGATIVO	
	106	NEGATIVO	NEGATIVO	
	107	NEGATIVO	NEGATIVO	

Anexo 2: Resultados de los aislamientos virales desarrollados en las muestras de 2015, de acuerdo a su procedencia.

POOL	1° PASAJE CULTIVO	2° PASAJE CULTIVO	INDIVIDUALIZACION DE MUESTRAS		
	Hemoaglutinación	Hemoaglutinación	Muestra	HA	Título hemoaglutinante
10	POSITIVO	NO REALIZADO	46	-	
			47	+	A (1/8) B (1/16)
			48	-	
			49	-	
			50	-	
14	NEGATIVO	POSITIVO	66	+	A (1/2)
			67	-	
			68	-	
			69	-	
			70	-	
17	POSITIVO	NO REALIZADO	81	-	
			82	-	
			83	-	
			84	+	A (1/32) B (1/32)
			85	-	
18	POSITIVO	NO REALIZADO	86	+	A (1/16) B (1/16)
			87	-	
			88	+	A (1/4) B (1/128)
			89	-	
			90	-	
21	POSITIVO	NO REALIZADO	101	-	
			102	-	
			103	-	
			104	+	A (1/16) B (1/32)
			105	-	
22	NEGATIVO	POSITIVO	106	-	
			107	-	
			108	-	
			109	-	
			110	+	A (1/64) B (1/64)
24	POSITIVO	NO REALIZADO	116	+	B (1/4)
			117	+	A (1/4) B (1/16)
			118	-	
			119	-	
			120	-	
25	POSITIVO	NO REALIZADO	121	-	
			122	-	
			123	-	
			124	+	A (1/16) B (1/64)
			125	-	
26	POSITIVO	NO REALIZADO	126	+	A (1/4) B (1/4)
			127	-	
			128	-	
			129	-	
			130	-	
27	POSITIVO	NO REALIZADO	131	-	
			132	+	A (1/32) B (1/32)
			133	-	

Anexo 3: Cuadro resumen de las muestras hemoaglutinantes recolectadas durante la campaña del año 2014.

N°	Localidad	Fecha	Especie	Edad	Largo total	Largo ala	Largo cola	Peso	Observaciones
47	Kopaitic	28-01-2014	<i>Pygoscelis papua</i>	Adulto	80,1	22,9	21,7	6,8	Saliendo del agua
66	Kopaitic	28-01-2014	<i>Pygoscelis papua</i>	Adulto	75,3	21,6	19,3	6,1	Saliendo del agua
84	Kopaitic	28-01-2014	<i>Pygoscelis papua</i>	Adulto	73,4	21,1	20,6	5,6	Saliendo del agua
86	Kopaitic	28-01-2014	<i>Pygoscelis papua</i>	Adulto	72,4	21,5	19,4	5,5	Saliendo del agua
88	Kopaitic	28-01-2014	<i>Pygoscelis papua</i>	Adulto	76,7	22	19,7	5,5	Saliendo del agua
104	Kopaitic	29-01-2014	<i>Pygoscelis papua</i>	Adulto	76,1	21,1	21,2	5,4	
110	Kopaitic	29-01-2014	<i>Pygoscelis papua</i>	Adulto	75,7	22,7	18,8	5,6	
116	Kopaitic	29-01-2014	<i>Pygoscelis papua</i>	Adulto	76,3	23,2	22,4	5	
117	Kopaitic	29-01-2014	<i>Pygoscelis papua</i>	Adulto	79,8	24,1	21,7	6,1	
124	Kopaitic	29-01-2014	<i>Pygoscelis papua</i>	Adulto	75,3	20,7	17,9	5,75	
126	Kopaitic	29-01-2014	<i>Pygoscelis papua</i>	Adulto	72,7	21,8	18,5	5,5	
132	Kopaitic	29-01-2014	<i>Pygoscelis papua</i>	Adulto	69,8	21,6	19,8	5,25	

Anexo 4: Antecedentes morfológicos de los pingüinos positivos a los ensayos de hemoaglutinación durante la campaña de recolección de 2014. Medidas y Pesos se encuentran expresados en centímetros (cm) y kilogramos (kg), respectivamente

KU662357.1 Newcastle disease virus (APMV-1)	GATGATCTCGATTTGCTGGGATCCAACTTTGCTGCAAGCAAGATCACATTGTCTGCGTCTGCACTGGTACAG
GQ288386.2 Newcastle disease virus (APMV-1)	AAACCAACAACTTTGCTGCAAGCAAGATCACATTGTCTGCGTCTGCACTGGTACAG
JX401405.1 Newcastle disease virus (APMV-1)	AAACCAACAACTTTGCTGCAAGCAAGATCACATTGTCTGCGTCTGCACTGGTACAG
EU338414.1 Avian paramyxovirus 2 (APMV-2)	CTAAGGCATATAATGCTGCTGCAAGCAAGATCACATTGTCTGCGTCTGCACTGGTACAG
NC_028245.1 Avian paramyxovirus 2 (APMV-2)	CTAAGGCATATAATGCTGCTGCAAGCAAGATCACATTGTCTGCGTCTGCACTGGTACAG
NC_025373.1 Avian paramyxovirus 3 (APMV-3)	CTAAGGCATATAATGCTGCTGCAAGCAAGATCACATTGTCTGCGTCTGCACTGGTACAG
FJ177514.1 Avian paramyxovirus 4 (APMV-4)	CTAAGGCATATAATGCTGCTGCAAGCAAGATCACATTGTCTGCGTCTGCACTGGTACAG
NC_025361.1 Avian paramyxovirus 5 (APMV-5)	CTAAGGCATATAATGCTGCTGCAAGCAAGATCACATTGTCTGCGTCTGCACTGGTACAG
KF267717.1 Avian paramyxovirus 6 (APMV-6)	CTAAGGCATATAATGCTGCTGCAAGCAAGATCACATTGTCTGCGTCTGCACTGGTACAG
KT962980.1 Avian paramyxovirus 6 (APMV-6)	CTAAGGCATATAATGCTGCTGCAAGCAAGATCACATTGTCTGCGTCTGCACTGGTACAG
FJ231524.1 Avian paramyxovirus 7 (APMV-7)	CTAAGGCATATAATGCTGCTGCAAGCAAGATCACATTGTCTGCGTCTGCACTGGTACAG
FJ215863.2 Avian paramyxovirus 8 (APMV-8)	CTAAGGCATATAATGCTGCTGCAAGCAAGATCACATTGTCTGCGTCTGCACTGGTACAG
NC_025390.1 Avian paramyxovirus 9 (APMV-9)	CTAAGGCATATAATGCTGCTGCAAGCAAGATCACATTGTCTGCGTCTGCACTGGTACAG
HM147142.2 Avian paramyxovirus 10 (APMV-10)	CTAAGGCATATAATGCTGCTGCAAGCAAGATCACATTGTCTGCGTCTGCACTGGTACAG
JQ886184.1 Avian paramyxovirus 11 (APMV-11)	CTAAGGCATATAATGCTGCTGCAAGCAAGATCACATTGTCTGCGTCTGCACTGGTACAG
NC_025363.1 Avian paramyxovirus 12 (APMV-12)	CTAAGGCATATAATGCTGCTGCAAGCAAGATCACATTGTCTGCGTCTGCACTGGTACAG
KX119151.2 Avian paramyxovirus 13 (APMV-13)	CTAAGGCATATAATGCTGCTGCAAGCAAGATCACATTGTCTGCGTCTGCACTGGTACAG
KU646513.1 Avian paramyxovirus 13 (APMV-13)	CTAAGGCATATAATGCTGCTGCAAGCAAGATCACATTGTCTGCGTCTGCACTGGTACAG
Penguin Paramyxovirus A	CTAAGGCATATAATGCTGCTGCAAGCAAGATCACATTGTCTGCGTCTGCACTGGTACAG
Penguin Paramyxovirus B	CTAAGGCATATAATGCTGCTGCAAGCAAGATCACATTGTCTGCGTCTGCACTGGTACAG
Penguin Paramyxovirus C	CTAAGGCATATAATGCTGCTGCAAGCAAGATCACATTGTCTGCGTCTGCACTGGTACAG

Anexo 5: Sitios conservados dentro del fragmento genético analizado (70 pb). Incluye representantes de todas las especies de *Avulavirus* y los APMV detectados en este proyecto, denominados como: Penguin paramyxovirus A, B Y C

CERTIFICADO N° 72

Santiago, 13 de Abril del 2016

El Comité de Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, ha revisado proyecto de tesis para optar al grado de Magister titulado: "Detección e identificación de paramyxovirus aviares en poblaciones de Pinguino papúa (*Pygoscelis papua*) del territorio Antártico Chileno", del Sr. José del Río y cuyo profesor tutor es el Dr. Víctor Neira y co-tutor Dr. Cristóbal Briceño, académicos de FAVET.

En el proyecto se estipulan entre otras, las siguientes medidas de Bioseguridad:

- 1.- Uso de vestimenta e implementos de protección adecuada para realizar el trabajo en el laboratorio.
- 2.- Los estudios se realizarán en un gabinete de bioseguridad y en un laboratorio que presenta nivel de bioseguridad adecuado. Se utilizarán protocolos adecuados para desinfección de los laboratorios.
- 3.- Todos los materiales de desecho, serán descontaminados y autoclavados, antes de ser eliminados.

El proyecto fue revisado por el comité en base a las especificaciones contenidas en el "Manual de Bioseguridad" de Conicyt (versión 2008) y el "Manual de Bioseguridad" de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2012) que previenen los riesgos para las personas, los animales y el medioambiente.


LISETTE LAPIERRE ACEVEDO
Coordinadora
Comité de Bioseguridad



Anexo 6: Certificado otorgado por el Comité de Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile



Santiago, 12 de abril de 2016

CERTIFICADO N° 08-2016

En relación con los procedimientos propuestos para el uso de animales experimentales, y teniendo a la vista la metodología del Proyecto de Tesis de Magister: "**Detección e identificación de paramyxovirus aviare en poblaciones de Pingüino papúa (*Pygoscelis papua*) del territorio Antártico Chileno**". Este comité extiende que dicho proyecto corresponde a un proyecto de Tesis de Magister del Sr. **José del Río M.**, quien será patrocinado por el **Dr. Víctor Neira** del Departamento de Medicina Preventiva Animal de FAVET.

De acuerdo a los detalles contenidos en el Formulario para obtención de certificado de Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, este Comité certifica que el Proyecto satisface lo estipulado en la guía de principios directrices internacionales para el uso de animales en investigación biomédica, elaborada por el Consejo para las Organizaciones Internacionales de las Ciencias Biomédicas, adecuada y adoptada por este Comité, y se ajusta a la legislación chilena vigente sobre la materia, incluida la Norma NCh 324-2011.

A este respecto el Comité entiende que se trabajará con un máximo de 600 huevos embrionados de Gallina doméstica, no requiriendo la manipulación de ninguna otra especie de acuerdo a lo estipulado en el formulario.


Dra. Tamara Tadić G.
Director
Comité de Bioética Animal




Dr. Santiago Urcelay V.
Presidente
Comité de Bioética Animal

Anexo 7: Certificado otorgado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile