



**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS y PECUARIAS
ESCUELA DE POSTGRADO Y POSTÍTULO**

**DETERMINACIÓN DE LA RELACIÓN ENTRE PREVALENCIA
DE VIRUS INFLUENZA AVIAR Y ESTACIONALIDAD DE LAS
COMUNIDADES DE AVES SILVESTRES EN LOS SECTORES
HUMEDAL LAGUNA CARTAGENA Y RESERVA NACIONAL
LAGO PEÑUELAS**

SOLEDAD GONZÁLEZ VALENZUELA

**Tesis para optar al Grado de
Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias**

Santiago-Chile

2017



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS y PECUARIAS
ESCUELA DE POSTGRADO Y POSTÍTULO

**DETERMINACIÓN DE LA RELACIÓN ENTRE PREVALENCIA
DE VIRUS INFLUENZA AVIAR Y ESTACIONALIDAD DE LAS
COMUNIDADES DE AVES SILVESTRES EN LOS SECTORES
HUMEDAL LAGUNA CARTAGENA Y RESERVA NACIONAL
LAGO PEÑUELAS**

SOLEDAD GONZÁLEZ VALENZUELA

**Tesis para optar al Grado de
Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias**

DIRECTOR DE TESIS: DR. CHRISTOPHER HAMILTON-WEST M.

Santiago-Chile

2017



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS y PECUARIAS
ESCUELA DE POSTGRADO Y POSTÍTULO

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

SE INFORMA A LA DIRECCIÓN DE POSTGRADO Y POSTÍTULO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS, QUE LA TESIS DE MAGÍSTER PRESENTADA POR LA CANDIDATA


SOLEDAD GONZÁLEZ VALENZUELA

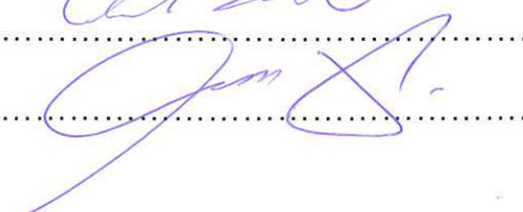
HA SIDO APROBADA POR LA COMISIÓN EVALUADORA DE TESIS COMO REQUISITO PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS ANIMALES Y VETERINARIAS, EN EXAMEN DE DEFENSA DE TESIS RENDIDO EL DÍA 20 DE NOVIEMBRE DE 2017

DIRECTOR DE TESIS

DR. CHRISTOPHER HAMILTON-WEST M. 

COMISIÓN EVALUADORA E INFORMANTE DE TESIS

DR. CRISTÓBAL BRICEÑO U. 

DR. CLAUDIO VERDUGO R. 

**Esta Tesis de Grado se realizó en el Laboratorio de Epidemiología del
Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias
Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile**

y contó con financiamiento

NIAID HHSN272201400006C

BIOGRAFÍA

Mi nombre es Soledad González Valenzuela, nací el 7 de mayo del año 1991 en la comuna de San Bernardo, Santiago de Chile. En el año 1994 y a la edad de tres años, ingreso a pre-kínder al Colegio particular El Prado ubicado en la comuna de Pudahuel y es en este establecimiento donde curso toda mi enseñanza básica y media, finalizando mi escolaridad el año 2008 a los 17 años. Posteriormente, en el año 2009 ingreso a estudiar Medicina Veterinaria en la Universidad de Las Américas (UDLA). Durante mi época de pregrado, específicamente el año 2013, me es otorgada por la universidad, la beca de excelencia académica para participar del “Programa de Certificación Internacional en Medicina Veterinaria” realizada en la Universidad Anhembi Morumbi, Sao Paulo, Brasil. Este mismo año, egreso de la carrera para posteriormente el año 2014 titularme con distinción máxima de la misma, realizando mi tesis titulada “Situación actual en Chile de la Terapia Asistida con Perros”. Durante el año 2014, trabajé en el área de clínica menor realizando turnos en diversas clínicas, sin embargo, quise cambiar de área dentro de mi profesión y ampliar así mis conocimientos cursando un postgrado, ingresando el año 2015 al programa de Magíster en Ciencias Animales y Veterinarias de la Universidad de Chile. De manera simultánea y dentro de la realización de este, cursé el programa de Diploma de postítulo en Conservación y Manejo de Fauna Silvestre en la misma universidad el año 2016, año en el cual comienzo a realizar la presente tesis en el departamento de medicina preventiva, en la Unidad de Epidemiología a cargo del Dr. Christopher Hamilton-West.

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia quisiera agradecer profundamente a mis padres Claudio y Elena, por apoyarme en todos los sentidos, de la manera más incondicional que existe y por entregarme las herramientas necesarias que me permiten alcanzar cada logro en mi vida, sin ustedes, nada sería posible. Gracias papá por enseñarme a nunca rendirme, a que puedo ser la mejor si me lo propongo, a que “el acero no es acero si no pasa por el fuego” y por sobre todo gracias por creer en mí y ser mi *partner* en cada desafío que emprendo. A ti mamá agradecerte por cada abrazo de contención, por tu preocupación infinita por mí, por heredarme tu fortaleza única, simplemente gracias por ser mi madre. A ambos decirles que el orgullo que sienten por mí, es la más significativa e importante de las recompensas a mi esfuerzo. De igual manera, quisiera agradecer infinitamente a mi perro Yoyo, mi compañero más leal, la alegría de mis días, el que con solo su presencia y silencio me contiene en los momentos más difíciles, el cual hace ya seis años llegó a mi mundo, para cambiarlo y llenarlo por completo, ojalá la vida y Dios me permitan disfrutar de su compañía y amor por muchísimos años más.

Agradecer con igual cariño a mi pareja de hace cuatro años, Javier, que con su paciencia eterna, su comprensión infinita y su fe inagotable en mí, se convirtió en un pilar fundamental durante todo este proceso y en mi vida en general, sin tu compañía, todo sería más difícil. Gracias por cada palabra, gesto, y abrazo que me entregas cuando más lo necesito.

A mi tatas por su inmenso amor, dulzura y cariño, por enseñarme el amor y el respeto por los animales desde pequeña. Agradecerles también a mis amigos de la vida por cada momento vivido y por cada risa a carcajadas. A mis compañeros de Magíster, los que con el paso del tiempo se fueron convirtiendo en amigos.

No puedo dejar de agradecer a todo el equipo perteneciente a la Unidad de Epidemiología, a cargo de mi profesor guía, el Dr. Christopher Hamilton-West, el cual me ha dado la confianza y el apoyo, abriéndome las puertas de su equipo para realizar mi tesis junto a ellos, conociendo en el procesos a muy lindas personas.

Finalmente a mi ángel de la guarda, mi hermana Pamela, la que pesar de su ausencia física, donde sea que se encuentre, siempre está a mi lado, cuidándome, apoyándome y acompañándome en cada etapa de mi vida.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

BIOGRAFÍA.....	1
AGRADECIMIENTOS.....	2
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	3
INDICE DE TABLAS.....	5
INDICE DE FIGURAS ILUSTRATIVAS.....	6
INDICE DE ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN.....	8
SUMMARY.....	9
I. - INTRODUCCIÓN.....	10
II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	12
VIRUS INFLUENZA A.....	12
2.1 ETIOLOGÍA.....	12
2.1.1 Morfología y estructura viral.....	12
2.1.2 Clasificación.....	12
2.1.3 Patogenicidad viral.....	13
INFLUENZA AVIAR.....	13
2.2 DEFINICIÓN.....	13
2.3 HISTORIA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.....	14
2.3.1 Brote de Influenza Aviar de Alta Patogenicidad (H7N3) en Chile.....	14
2.4 IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA.....	15
2.5 TRANSMISIÓN.....	15
2.6 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	16
2.6.1 Ecología de los virus.....	16
2.6.2 Supervivencia del virus en el ambiente.....	16
2.6.3 Aves silvestres.....	17
2.7 SIGNOS CLÍNICOS.....	22
2.8 VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA.....	22
2.9 INFLUENZA AVIAR EN EL MUNDO.....	23
2.9.1 Situación en América del Norte.....	23

2.9.2 Situación en América del Sur	23
2.9.3 Situación en Chile	24
III.- HIPÓTESIS	25
IV.- OBJETIVOS	26
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	26
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
V.- MATERIALES Y METODOS	27
Zona de estudio	27
Humedal Laguna Cartagena	27
Lago Peñuelas.....	27
5.1 METODOLOGÍA.....	28
5.1.1 Caracterización de las comunidades de aves silvestres:.....	28
5.1.2 Estimación de la prevalencia:.....	29
5.1.3 Análisis de la asociación entre estacionalidad y prevalencia:.....	32
VI. – RESULTADOS	33
6.1 Caracterización de las comunidades de aves silvestres	33
6.2 Estimación de prevalencia	41
6.3 Asociación entre estacionalidad y prevalencia.....	42
VII. – DISCUSIÓN	45
7.1 Caracterización de las comunidades de aves silvestres	45
7.2 Estimación de prevalencia.....	49
7.3 Asociación entre estacionalidad y prevalencia.....	53
VIII. – CONCLUSIONES	56
IX. - BIBLIOGRAFÍA CITADA	57

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies de aves silvestres migratorias y residentes identificadas en el Humedal Laguna Cartagena.....	18
Tabla 2. Especies de aves silvestres migratorias y residentes identificadas en la Reserva Nacional Lago Peñuelas.....	19
Tabla 3. Fechas de los censos realizados en Humedal Laguna Cartagena y Reserva Nacional Lago Peñuelas.....	33
Tabla 4. Frecuencias absolutas y frecuencias relativas de individuos censados por especies de aves silvestres residentes y visitantes identificadas en Humedal Laguna Cartagena entre noviembre de 2015 y agosto de 2016.....	35
Tabla 5. Índices de diversidad de <i>Shannon-Wiener</i> (H') y de equidad de <i>Pielou</i> (J') en los distintos meses de muestreo para las aves silvestres presentes en el Humedal Laguna Cartagena.....	37
Tabla 6. Frecuencias absolutas y frecuencias relativas de individuos censados por especies de aves silvestres residentes y visitantes identificadas en la Reserva Nacional Lago Peñuelas entre diciembre de 2015 y julio de 2016.....	39
Tabla 7. Índices de diversidad de <i>Shannon-Wiener</i> (H') y de equidad de <i>Pielou</i> (J') en los distintos meses de muestreo para las aves silvestres presentes en la Reserva Nacional Lago Peñuelas.....	40
Tabla 8. Resultados de muestras analizadas mediante la prueba rRT-PCR pertenecientes a aves silvestres presentes en el Humedal Laguna Cartagena entre septiembre de 2015 y agosto de 2016.....	41
Tabla 9. Resultados de muestras analizadas mediante la prueba rRT-PCR pertenecientes a aves silvestres presentes en la Reserva Nacional Lago Peñuelas entre septiembre de 2015 y julio de 2016.....	42
Tabla 10. Variables consideradas en el análisis de regresión logística simple para ambos sitios.....	43
Tabla 11. Resultados de Regresión Logística Simple para asociación entre positividad a Influenza y estacionalidad de ensamblajes de aves silvestres en el HLC.....	43
Tabla 12. Resultados de Regresión Logística Simple para asociación entre positividad a Influenza y estacionalidad de ensamblajes de aves silvestres en la RNLP.....	44

INDICE DE FIGURAS ILUSTRATIVAS

Figura 1. Rutas migratorias de las poblaciones de aves silvestres. Los puntos negros indican las ubicaciones de los centros de vigilancia históricos y actuales del virus de Influenza Aviar.....22

Gráfico 1. Abundancia comparativa entre especies de aves silvestres residentes y visitantes y abundancia total de individuos censados por mes en el Humedal Laguna Cartagena.....34

Grafico 2. Abundancia comparativa entre individuos pertenecientes a especies visitantes y especies residentes censados por mes en el Humedal Laguna Cartagena..... 34

Grafico 3. Abundancia comparativa entre especies de aves silvestres residentes y visitantes y abundancia total de individuos censados por mes en La Reserva Nacional Lago Peñuelas.....38

Grafico 4. Abundancia comparativa entre individuos pertenecientes a especies visitantes y especies residentes censados por mes en la Reserva Nacional Lago Peñuelas.....38

INDICE DE ABREVIATURAS

CONAF	: Corporación Nacional Forestal
FAO	: Organización de las Naciones Unidad para la Alimentación y la Agricultura
HA	: Hemaglutinina
HA1	: Sitio de partición de la hemaglutinina 1
HA2	: Sitio de partición de la hemaglutinina 2
HLC	: Humedal Laguna Cartagena
IA	: Influenza aviar
IABP	: Influenza aviar de baja patogenicidad
IAAP	: Influenza aviar de alta patogenicidad
M1	: Proteína de membrana 1
M2	: Proteína de membrana 2
NA	: Neuraminidasa
nm	: Nanómetros
NP	: Nucleoproteína
OIE	: Organización Internacional de Epizootias
OMS	: Organización Mundial de la Salud
PA	: Proteína ácida de la polimerasa
PB1	: Proteína básica polimerasa 1
PB2	: Proteína básica polimerasa 2
pH	: Potencial de hidrogeniones
ppm	: Partes por millón
RNA	: Ácido ribonucleico
RNLP	: Reserva Nacional Lago Peñuelas
SAG	: Servicio Agrícola y Ganadero
SENASA	: Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria
USDA	: United States Departament of Agriculture
VIA	: Virus de Influenza Aviar
SPT	: Sistema de Producción de Traspatio

RESUMEN

Los virus de Influenza tipo A representa una amenaza latente para la salud pública y para la salud animal. Debido a esto, y a raíz de la creciente preocupación por los focos de influenza aviar de alta patogenicidad que se registran en diferentes regiones del mundo, actualmente se lleva a cabo una vigilancia epidemiológica constante de estos virus por parte de diversas organizaciones de salud, monitoreando desde planteles comerciales hasta poblaciones de aves silvestres, especialmente de aquellas catalogadas como migratorias. Sin embargo, la información existente sobre estos virus en poblaciones silvestres en América del Sur aún es muy limitada. Las aves silvestres, especialmente aquellas relacionadas con ambientes acuáticos, son consideradas como reservorios de la gran mayoría de los subtipos de virus de influenza A conocidos y tienen el potencial de diseminarlos entre países e incluso continentes por medio de las rutas migratorias, debido a esto, resulta fundamental generar esta información epidemiológica. Este estudio, realizó un muestreo en los sectores Humedal Laguna Cartagena (HLC) y la Reserva Nacional Lago Peñuelas (RNLP), entre Septiembre de 2015 y Agosto de 2016. El objetivo de este estudio, fue la detección de virus de influenza A en muestras de heces de aves silvestres mediante rRT-PCR, determinando una relación entre la prevalencia del virus detectada y la estacionalidad de las comunidades de aves silvestres presentes durante el muestreo. Se recolectaron un total de 2.579 muestras ambientales (1.148 de HLC y 1.431 de la RNLP) y paralelamente, mediante la realización de censos se identificaron un total de 5.091 aves (3.815 en HLC y 1.276 en RNLP) pertenecientes a 46 especies, de las cuales 39 fueron clasificadas como residentes, 5 como visitantes de primavera-verano y 2 como visitantes de otoño-invierno. El análisis de las muestras indicó una prevalencia a VIA de un 0,4% (5/1.148) para el HLC y de un 1,04% (15/1.431) para la RNLP. Casi la totalidad de las muestras positivas fueron detectadas durante los meses de verano, siendo Diciembre y Enero los meses que presentaron los valores de prevalencia más altos, lo cual coincidió con una mayor presencia y abundancia de aves migratorias de origen boreal. Los factores de riesgo que presentaron asociación estadísticamente significativa fueron una abundancia de individuos baja (<200) (OR = 9,71; $p = 0,0424$) en el HLC y la estación del año, correspondiente a primavera-verano (OR 5,47 y $p = 0,0288$) en la RNLP. Los resultados de este estudio demuestran la presencia de virus de influenza A en los ecosistemas de ambos sitios y la asociación con la estacionalidad de las poblaciones de aves silvestres presentes en ellos.

Palabras claves: Virus de Influenza A, Aves Silvestres, Estacionalidad, Prevalencia.

SUMMARY

Influenza type A viruses represent a constant threat to both public and animal health. Therefore, and because of growing concern on high pathogenic avian influenza outbreaks around the world, health organizations maintain a strong epidemiological surveillance of this virus, monitoring from avian production systems till wild birds populations, especially the ones are catalogued as migratory birds. However, there is short information at moment about these types of viruses in wilds populations on South America. Wild birds, especially the ones are related with aquatic environment, are considered as reservoir of the most known influenza A virus and his subtypes, also they has the potential to disseminate the virus across countries or continents by migratory routes. Due to this, is extremely important generate this epidemiologic information. This Study, performed a sampling in Cartagena Lagoon Wetland y Peñuelas Lake National Reserve, between September 2015 and August 2016. The aim of this study was detect influenza A virus on samples feces of wild birds using rRT-PCR, determining a relationship between the prevalence of the virus and the seasonality of wild birds population. Were collected a number of 2.579 environmental samples (1.148 from HLC and 1.431 from RNLP), also it was possible by a census, identified 5.091 birds (3.815 in HLC and 1.276 in RNLP) belonging to 46 species, which one 39 were classified as residents birds, 5 as spring/summer visitors and 2 as an autumn/winter visitors. The analysis of the samples showed a prevalence to avian influenza virus of 0,4% (5/1.148) for HLC and a 1,04% (15/1.431) for RNLP. Almost all positive samples were detected in summer months, December and January showed the highest prevalence values, which coincided with a greater presence and abundance of boreal migratory birds. The risk factors that showed significant statistics association were low individuals abundance (<200) (OR = 9,71; $p = 0,0424$) in HLC and autumn/winter season (OR 5,47 y $p = 0,0288$) in RNLP.

Key words: Influenza A Virus, Wild Birds, Seasonality, Prevalence.

I. - INTRODUCCIÓN

La influenza aviar es una enfermedad infecciosa aguda altamente transmisible de las aves, que ha sido considerada en los últimos años como una de las enfermedades más importantes en el mundo por sus consecuencias sobre la salud pública, ya que algunos virus de influenza aviar adquieren la capacidad de infectar a mamíferos, incluido el hombre (García y Ramos, 2006), y por su importancia en la industria avícola, debido a que presenta una elevada tasa de morbilidad y mortalidad en aves domésticas afectadas, cuando se presenta la infección por cepas de alta patogenicidad (Capua y Alexander, 2009).

Las aves silvestres, especialmente aquellas relacionadas con ambientes acuáticos, son consideradas como reservorios de la gran mayoría de los subtipos de virus de influenza A conocidos (Boyce *et al.*, 2009). Es por esto, que la migración de las aves acuáticas, representa el mayor riesgo de diseminación del virus de la influenza aviar y, plantea una compleja red debido a que sus diferentes rutas se superponen geográficamente. Cuando las aves vuelan a través de sus rutas de migración tienen el potencial de diseminar los virus de influenza aviar entre países e incluso continentes (Olsen *et al.*, 2006). En América del Norte se ha encontrado una tasa de ocurrencia cíclica en el aislamiento de VIA en aves silvestres, con *peaks* de prevalencia anuales o bianuales en anátidas durante la época de primavera-otoño (Krauss *et al.*, 2004) y en el caso de Europa, las mayores prevalencias en anátidas se ha observado durante la época de otoño (Munster *et al.*, 2007). Actualmente, en América del Sur existe escasa información sobre infecciones por virus de influenza aviar en poblaciones silvestres (Gherzi *et al.*, 2011).

Chile ha sido el único país de América del Sur donde se ha presentado un brote de influenza aviar de alta patogenicidad el año 2002, en granjas de aves reproductoras en la región de Valparaíso. En aquella ocasión, un total de 617.800 pollos de engorda y 116.000 huevos para incubar fueron sacrificados bajo supervisión oficial (Rojas *et al.*, 2002).

Por otra parte, ya sea como causa o consecuencia de que las aves acuáticas silvestres sean hospederos naturales de los virus de influenza aviar, los humedales costeros cumplen una importante rol en su eco-epidemiología (USDA, 2007; Beldoménico y Uhart, 2008).

A pesar de la alta riqueza de especies que presentan estos ambientes, en Chile existe una carencia de estudios sobre la estructura y dinámica de los ensambles de aves en estos humedales (González *et al.*, 2011), es por esto, que no está claramente descrito cómo están conformados estos ensambles, cuáles y cuántas son las especies que dominan y cuáles son aquellas que parecen como las más raras, con menores abundancias y/o menos frecuentes (Vilina y Cofré, 2006).

En este contexto, y debido a la importancia para la salud pública y animal que envuelven los brotes de influenza aviar, tanto en nuestro país como en el mundo y debido a la importancia de las aves silvestres en la diseminación del virus, se presenta como un componente importante y poco estudiado en el contexto actual de la epidemiología de la influenza aviar, la identificación de la composición y estacionalidad de los ensambles de aves silvestres que habitan en los humedales de nuestro país.

Debido a esta carencia de información, sumada a la escases de estudios que existe actualmente sobre los virus de influenza aviar en América del Sur, resulta fundamental generar información epidemiológica que constituya una relación directa entre ambas temáticas, con el propósito de entender de manera más amplia la eco-epidemiología de los virus de influenza aviar.

La presente tesis tiene como objetivo establecer esta información mediante la detección de virus de influenza aviar en muestras ambientales, específicamente de heces provenientes de aves silvestres migratorias y residentes obtenidas en los sectores del Humedal Laguna Cartagena y la Reserva Nacional Lago Peñuelas, ubicados en la Región de Valparaíso, en Chile y de manera simultánea, caracterizar las comunidades de aves silvestres presente en ambos sitios durante los muestreos, con el propósito de generar una relación entre ambos datos obtenidos. Los principales factores a considerar en la elección de ambos sitios de muestreo fueron; la alta diversidad de aves silvestres que se congregan en estos sitios durante el año y su ubicación geográfica, ya que ambos sitios de ubican en la misma región donde se presentaron los brotes de IAAP (H7N3) el año 2002.

II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

VIRUS INFLUENZA A

2.1 ETIOLOGÍA

Los VI están clasificados dentro de la familia Orthomyxoviridae, en la cual existen actualmente seis géneros; *Influenzavirus A*, *Influenzavirus B*, *Influenzavirus C* *Influenzavirus D* (comúnmente conocidos como tipos A, B y C), *Thogotovirus* (virus transmitido en forma ocasional a mamíferos por garrapatas) e *Isavirus* (virus responsable de la anemia infecciosa del salmón) (Hause *et al.*, 2014). Los virus de la Influenza tipo A son los únicos *orthomyxovirus* conocidos que afectan a las aves. Sin embargo, pueden también infectar a otras especies como cerdos, caballos, ballenas, lobos de mar y humanos. Mientras que los tipos B y C solo infectan a los humanos (Herrero, 2008).

2.1.1 Morfología y estructura viral

El virus morfológicamente puede ser extremadamente variable, que va desde partículas esféricas con un diámetro de 80 a 120 nm a las formas filamentosas que pueden medir varias micras de longitud (Palese y Shaw, 2007).

En cuanto a su estructura, los VIA corresponden a virus RNA segmentados de hebra simple y polaridad negativa ((-)ssRNA) (Nayak *et al.*, 2013). Todos los virus de la Influenza Aviar tienen ocho segmentos de genes diferentes que codifican para, al menos, 10 proteínas virales distintas. En el virión maduro se pueden dividir las proteínas de superficie que incluyen las Hemaglutininas (HA), Neuraminidasa (NA), el canal de iones de membrana (M2) y las proteínas internas, incluyendo la nucleoproteína (NP), la proteína de matriz (M1), y el complejo de la polimerasa compuesta por la proteína básica polimerasa 1 (PB1), proteína básica polimerasa 2 (PB2) y la proteína ácida de la polimerasa (PA) (Palese y Shaw, 2007).

2.1.2 Clasificación

Además de su especificidad de infección en las distintas especies de animales, los *influenzavirus* pueden distinguirse principalmente por las variaciones antigénicas entre las proteínas M2 Y NP que se utilizan para la caracterización del virus y que son específicos para cada género (Wright y Webster, 2001). El grado de variabilidad antigénica en sus glicoproteínas de superficie y número de segmentos de RNA son también características distintivas entre los virus de influenza (Strauss y Strauss, 2008).

2.1.3 Patogenicidad viral

Los VI, son considerados genéticamente inestables ya que no poseen mecanismos de reparación de errores durante el proceso de replicación de material genético, generando una acumulación gradual de mutaciones puntuales que contribuyen a la creación de nuevas variantes antigénicas. El conjunto de estos cambios puntuales es conocido como “deriva antigénica” y ocurren con mayor frecuencia en los segmentos genómicos que codifican para la HA y NA (Webster y Hulse, 2004). Por otra parte, la emergencia de nuevas variantes antigénicas también puede ocurrir por un proceso de reordenamiento de segmentos genómicos entre distintos subtipos virales conocido como “cambio antigénico” (Maclachlan y Dubovi, 2011).

El gen HA es el principal determinante del cambio en la patogenicidad de los virus de influenza (Bosch *et al.*, 1979). Los virus de IABP se caracterizan por contener al menos dos aminoácidos básicos del tipo lisina y arginina en la región terminal de la HA1, que son cortadas por la enzima tripsina, la cual se encuentra sólo en células del tracto respiratorio y digestivo de las aves (Swayne y Halvorson, 2008). Mientras que los virus IAAP sufren una serie de cambios puntuales en su conformación estructural que pueden generar sustituciones e inserciones de múltiples aminoácidos básicos en la región terminal de la HA1. Los aminoácidos de la HA de IAAP son reconocidos por enzimas celulares del tipo furina que están presentes en muchas células de numerosos órganos viscerales, favoreciendo la replicación sistémica del virus (Suarez, 2006).

Hasta la fecha, todas las cepas altamente patógenas son de subtipos H5 y H7 (Alexander, 2007a). Las cepas de baja patogenicidad pueden ser de otros subtipos e inclusive de los H5 y H7. Sin embargo, estos pueden convertirse en cepas altamente patógenas, ya que se describe en general que las variantes de IAAP emergen después de la mutación de subtipos H5 o H7 de IA de baja patogenicidad, lo cual ocurre principalmente cuando estas cepas de virus circulante en poblaciones silvestres, se transmiten y pasan a poblaciones domésticas, produciendo infecciones con alta mortalidad (OIE, 2009).

INFLUENZA AVIAR

2.2 DEFINICIÓN

La influenza aviar (IA) es una enfermedad infecciosa viral altamente contagiosa causada por alguno de los subtipos de influenza aviar tipo A (OIE, 2009). Las aves silvestres acuáticas, principalmente las aves del orden Anseriformes y Charadriiformes,

representan el principal reservorio natural de todos los virus de Influenza de tipo A; donde la enfermedad generalmente se manifiesta de forma asintomática, sin manifestaciones clínicas (Spackman *et al.*, 2009). Estos virus son comunes en aves silvestres y a veces infectan a aves de corral. Sin embargo, en estas últimas la infección puede ser asintomática, producir cuadros de enfermedad leve o manifestaciones clínicas severas, incluyendo altos niveles de mortalidad (García *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2007).

2.3 HISTORIA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA

La primera descripción de un padecimiento identificable como influenza la realizó Hipócrates en el año 492 A.C. No obstante, la primera epidemia reconocida ocurrió en 1580 a la que los italianos llamaron como la “influenza planetaria”, por la asociación que hicieron con una serie de fenómenos astrales observados antes del brote, de donde se derivó el nombre actual de influenza (García *et al.*, 2006).

Desde 1955 hasta el 2000 se registraron dieciocho brotes de Influenza Aviar Altamente Patógena (IAAP) en pollos y pavos en diferentes países del mundo (Buscaglia, 2004). Mientras que, desde el año 2004, la cantidad de países afectados por el subtipo de alta patogenicidad aumenta exponencialmente, alcanzando hasta la fecha 74 países de todo el mundo, distribuidos principalmente en Asia y Europa, y con un menor número de casos en África y América del Norte (OIE, 2016a).

2.3.1 Brote de Influenza Aviar de Alta Patogenicidad (H7N3) en Chile

Hasta el año 2002 no existían informes de que la IAAP había ocurrido en América del Sur. Sin embargo, entre finales de abril y la primera semana de mayo del año 2002, una condición clínica caracterizada por una baja mortalidad, un ligero descenso en la producción de huevos, apareció en una granja de gallinas reproductoras en la región de Valparaíso. Se recogieron muestras de aves de las instalaciones afectadas, las cuales fueron posteriormente procesadas en el laboratorio; dando como resultado el aislamiento del virus de IABP del subtipo H7N3. El 23 de mayo, fue notificado al Servicio Agrícola y Ganadero, una enfermedad causante de una elevada mortalidad de aves en la misma granja (Rojas y Moreira, 2002). Una inspección oficial al día siguiente, dio como sospechoso a IAAP, la cual fue confirmada posteriormente por el laboratorio de referencia de Ames (EE.UU), con un aislamiento del virus, del subtipo H7N3 de alta patogenicidad. Todas las aves (617.800 pollos de engorda) y 116.000 huevos para incubar fueron sacrificados. En menos de tres meses se controlaron los dos focos desarrollados,

evitándose la diseminación de la enfermedad al resto del país. Solo seis meses después se declaró oficialmente a Chile libre de la enfermedad (Rojas y Moreira, 2002).

2.4 IMPORTANCIA EN SALUD PÚBLICA

La influenza aviar representa una de las enfermedades más importantes en salud pública. En humanos se ha demostrado que la infección por los virus es transitoria; y para traspasar la “barrera especie” debe ocurrir un cambio génico mayor (Webster *et al.*, 2007).

La infección con los subtipos H5N1 y H9N2 en la población humana en los años 1997 y 1999 son ejemplos de la transmisión inter-especie de virus aviáres, aunque no se produjo una pandemia por influenza debido a que la transmisión entre humanos fue ineficiente (Olsen, 2002). Desde el año 2013 en China, el subtipo de IABP H7N9 de origen aviar ha causado infección y enfermedad en la población humana incrementando la preocupación por la mortalidad asociada a su infección (Xian *et al.*, 2013).

Durante el presente siglo, ya se ha registrado un incidente pandémico causado por VI. En Abril del año 2009, una nueva pandemia humana surge a partir de un VIA H1N1 el cual estaba conformado por una combinación de genes de cuatro diferentes cepas de virus influenza; virus influenza humana, virus influenza porcina de Norte América y Asia, y virus influenza aviar de Norte América (Pinto *et al.*, 2010). Este nuevo linaje de VIA se diseminó rápidamente a nivel mundial, haciendo que la Organización Mundial de la Salud la declarara la primera pandemia en la población humana del siglo XXI.

La circulación continua de virus H5N1 en las aves de corral, especialmente cuando es enzoótica, sigue suponiendo una amenaza para la salud pública, dado que estos virus pueden causar enfermedad grave en el ser humano; además, cabe la posibilidad de que experimenten mutaciones (reordenamiento genético) lo que les permitiría tener una mayor eficiencia en la transmisión entre las personas. En un mundo tan interconectado como el actual, una epidemia local puede convertirse rápidamente en una pandemia, dejando poco tiempo para preparar una respuesta de salud pública que detenga la propagación de la enfermedad (OMS, 2014).

2.5 TRANSMISIÓN

Los virus de influenza aviar se transmiten fácilmente entre las aves (OIE, 2009). Algunas referencias reportan que la transmisión viral en forma general puede producirse principalmente de la siguiente manera:

- Por contacto directo con secreciones de aves infectadas, especialmente heces (fecal-oral) siendo más eficiente en espejos de agua dulce con bajas temperaturas (Stallknecht y Brown, 2009; Espinal, 2007; USDA, 2007).
- Por contaminación del ambiente; alimento, agua, equipos y ropa contaminados con secreciones de aves infectadas (Espinal, 2007).
- Por aves silvestres acuáticas y marinas clínicamente normales que pueden introducir el virus a las granjas (García *et al.*, 2006).
- Por huevos rotos contaminados que pueden infectar a los pollitos en la planta de incubación (Capua y Marangon, 2006).
- Por contacto de hospederos no específicos como porcinos domésticos; aves de compañía ó mascotas (USDA, 2007), e inclusive insectos como vectores mecánicos de los virus (OIE, 2009).

La transmisión de los virus de influenza aviar de alta patogenicidad tiende a ser más limitada por la rápida mortalidad que produce en gallináceas, no dando tiempo a la eliminación viral, a diferencia de los virus de baja patogenicidad (Alexander, 2007a).

2.6 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

La epidemiología de la influenza aviar en aves silvestres es definida por interacciones entre el hospedero, agente causal y el medio ambiente (Stallknecht y Brown, 2007).

2.6.1 Ecología de los virus

Investigaciones realizadas demostraron que las especies y la estructura de poblaciones de aves silvestres son importantes en el mantenimiento de los virus, su transmisión y posiblemente los movimientos a largas distancias (Stallknecht y Brown, 2007).

2.6.2 Supervivencia del virus en el ambiente

La supervivencia de estos virus en el medio ambiente depende de la temperatura, el pH, la salinidad y la presencia de materia orgánica (Brown *et al.*, 2007) Parecen sobrevivir mejor a bajas temperaturas y en agua fresca salobre (0,5 a 30 ppm de sólidos disueltos) más que en agua salina (30 a 50 ppm); (Brown JD *et al.*, 2007). Son relativamente estables solo con valores de pH comprendidos entre 6 y 8 (SENASA Argentina, 2009). Con respecto a la humedad como factor determinante en la supervivencia de estos virus en el ambiente, algunos datos proponen que zonas con bajas humedades relativas (20 – 35%) producidas principalmente por la combinación de un

calentamiento interno y temperaturas frías (5°C), parecen favorecer la mantención y dispersión de los VIA (Lowen *et al.*, 2007).

2.6.2.1 Presencia del virus en humedales

Ya sea como causa o consecuencia de que las aves acuáticas sean hospederos naturales de los virus de influenza aviar, los humedales cumplen un rol preponderante en su eco-epidemiología, existiendo factores que influyen en su importancia tales como (USDA, 2007; Beldoménico y Uhart, 2008):

- Las aves acuáticas (Anseriformes y Charadriiformes) son el reservorio natural de la mayoría de las cepas de virus de IA.
- La alta densidad de aves susceptibles de distintas especies que se congregan en estos sitios, aumentando la tasa de contacto entre aves infectadas y susceptibles.
- El agrupamiento de especies diferentes que hace posible la coinfección con varias cepas y el intercambio viral entre distintos hospederos, favoreciendo de esta manera la evolución del virus y la emergencia de nuevas variantes antigénicas (cepas virales).
- Los virus de influenza persisten mejor en agua dulce, potenciando así la principal ruta de transmisión descrita, correspondiente a la fecal-oral vía agua contaminada.
- El uso de estos lugares como sitios de escala por parte de aves migratorias que suponen una periódica inmigración y emigración de individuos potencialmente portadores de virus.

2.6.3 Aves silvestres

2.6.3.1 Estructura y estacionalidad poblacional

Los factores que determinan los patrones de distribución y abundancia de las aves acuáticas son complejos y no están bien estudiados. Para el caso de los humedales de la región central de Chile, en 1999 se identificó que el fenómeno El Niño Oscilación del Sur (ENOS) es un factor relevante para explicar los cambios que ocurren en algunos grupos de aves acuáticas (por ejemplo, zambullidores) que habitan en esta región del país (Vilina y Cofré, 2006).

Con respecto a la estacionalidad, los resultados de los censos realizados por el SAG entre los años 2011 y 2012 en todo el territorio nacional determinaron un incremento leve en el número de especies entre invierno y temporada estival, lo que indica la influencia de las migraciones sobre el valor de riqueza específica. Se observa y determina

la influencia de especies visitantes del territorio sobre el valor de diversidad, especialmente aquellas que vienen desde el hemisferio norte, mayoritariamente aves playeras (SAG, 2012).

En términos de riqueza, a nivel regional, el menor valor se encuentra en la VII y XI Región con 60 especies, mientras que el valor más alto se registra en la V Región la que presenta 106 especies (Vilina y Cofré, 2006). A continuación, en las tablas 1 y 2 se mencionan las especies de aves silvestres residentes y migratorias que han sido identificadas en el HLC y la RNLP respectivamente.

Tabla 1. Registros de especies de aves silvestres migratorias y residentes identificadas en el Humedal Laguna Cartagena:

Espece	Nombre común	Migratorias/Residentes
<i>Podiceps major</i>	Huala	Residente
<i>Phalacrocorax brasilianus</i>	Yeco	Residente
<i>Ardea cocoi</i>	Garza cuca	Residente
<i>Ardea alba</i>	Garza grande	Residente
<i>Egretta thula</i>	Garza chica	Residente
<i>Coscoroba coscoroba</i>	Cisne coscoroba	Migratoria invernal continental
<i>Cygnus melanocorypha</i>	Cisne de cuello negro	Residentes/Migratorias*
<i>Anas flavirostris</i>	Pato jergón chico	Migratoria invernal continental
<i>Anas sibilatrix</i>	Pato real	Migratoria invernal continental
<i>Anas georgica</i>	Pato jergón grande	Residente
<i>Anas clypeata</i>	Pato cuchara	M. invernal intercontinental
<i>Fulica rufifrons</i>	Tagua frente roja	Residente
<i>Fulica armillata</i>	Tagua	Residente
<i>Vanellus chilensis</i>	Queltehue	Residente
<i>Himantopus melanurus</i>	Perrito	Residente
<i>Charadrius collaris</i>	Chorlo de collar	Migratoria invernal continental
<i>Charadrius nivosus</i>	Chorlo nevado	Residente
<i>Tringa melanoleuca</i>	Pitotoy grande	Migratoria estival continental
<i>Tringa flavipes</i>	Pitotoy chico	Migratoria estival continental
<i>Calidris bairdii</i>	Playero de Baird	Migratoria estival continental
<i>Thinocorus rumicivorus</i>	Perdicita	Residente
<i>Larus dominicanus</i>	Gaviota dominicana	Residente
<i>Larus pipixcan</i>	Gaviota Franklin	Migratoria estival continental
<i>Larus maculipensis</i>	Gaviota cáhuil	Migratoria estival continental
<i>Rynchops niger</i>	Rayador	Migratoria estival continental

Fuente: CONAF (*) No existe información suficiente

Tabla 2. Registros de especies de aves silvestres migratorias y residentes identificadas en la Reserva Nacional Lago Peñuelas:

Especie	Nombre común	Migratorias/Residentes
<i>Anthus correndera</i>	Bailarín chico	Residente
<i>Elanus Leucurus</i>	Bailarín	Residente
<i>Gallinago paraguaiae</i>	Becacina	Residente
<i>Podiceps occipitalis</i>	Blanquillo	Residente
<i>Anairetes parulus</i>	Cachudito	Residente
<i>Asthenes humicola</i>	Canastero	Residente
<i>Falco sparverius</i>	Cernícalo	Migratoria estival continental
<i>Troglodytes aedon</i>	Chercán	Residente
<i>Zonothichia capensis</i>	Chincol	Residente
<i>Sicalis luteiventris</i>	Chirihue	Residente
<i>Charadrius nivosus occidentalis</i>	Chorlo nevado	Residente
<i>Cinclodes fuscus</i>	Churrete acanelado	Residente
<i>Coscoroba coscoroba</i>	Cisne Coscoroba	Migratoria invernal continental
<i>Cygnus melancorpha</i>	Cisne Cuello Negro	Residente/Migratoria
<i>Callipepla californica</i>	Codorniz	Residente
<i>Lessonia rufa</i>	Colegial	Migratoria invernal continental(*)
<i>Plegadis chihi</i>	Cuervo de Pantano	Residente
<i>Xolmis pyrope</i>	Diucón	Residente
<i>Egretta thula</i>	Garza chica	Residente
<i>Ardea cocoi</i>	Garza cuca	Residente
<i>Ardea alba</i>	Garza grande	Parcialmente migratoria
<i>Bubulcus ibis</i>	Garza Boyera	Migratoria intercontinental
<i>Chroicocephalus maculipennis</i>	Gaviota Cahüil	Migratoria estival continental
<i>Larus dominicanus</i>	Gaviota Dominicana	Residente
<i>Larus pipixcan</i>	Gaviota Franklin	Migratoria estival continental
<i>Larus modestus</i>	Gaviota Garuma	Residente
<i>Sterna hirundinacea</i>	Gaviotín Sudamericano	Residente
<i>Tachycineta leucopyga</i>	Golondrina chilena	Migratoria estival continental
<i>Pygochelidon cyanoleuca patagónica</i>	Golondrina dorso negro	Migratoria estival continental
<i>Passer domesticus</i>	Gorrión	Residente
<i>Podiceps major</i>	Huala	Residente
<i>Nycticorax nycticorax</i>	Huairavo	Migratoria (*)
<i>Ixobrychus involucris</i>	Huairavillo	Residente
<i>Carduelis basbatus</i>	Jilguero	Residente
<i>Coragyps atratus foetens</i>	Jote	Residente

<i>Cathartes aura</i>	Jote cabeza colorada	Residente
<i>Sturnella loyca</i>	Loica	Residente
<i>Molothrus bonariensis</i>	Mirlo	Residente
<i>Anas versicolor</i>	Pato Cappuccino	Residente
<i>Anas cyanoptera cyanoptera</i>	Pato Colorado	Residente
<i>Anas platalea</i>	Pato cuchara	Migratoria invernal intercontinental
<i>Anas bahamensis rubirostris</i>	Pato gargantillo	Residente/Migratoria (*)
<i>Anas flavirostris</i>	Pato Jergón Chico	Migratoria invernal continental
<i>Anas geórgica</i>	Pato Jergón Grande	Residente
<i>Oxyura vittata</i>	Pato Rana pico delgado	Residente
<i>Anas silibatrix</i>	Pato Real	Migratoria invernal continental
<i>Heteronetta atricapilla</i>	Pato Rinconero	Residente
<i>Ralus sanguinolentus</i>	Pidén	Residente
<i>Himantopus melanurus</i>	Perrito	Residente
<i>Parabuteo unicinctus unicinctus</i>	Peuco	Residente
<i>Pelecanus thagus</i>	Pelicano	Residente
<i>Sephanoides sephanoides</i>	Picaflor	Residente
<i>Patagona gigas gigas</i>	Picaflor gigante	Migratoria*
<i>Haematopus palliatus</i>	Pilpilén	Residente
<i>Podiceps rolland</i>	Pimpollo	Residente/migratoria
<i>Tringa flavipes</i>	Pitotoy chico	Migratoria estival continental
<i>Tringa melanoleuca</i>	Pitotoy grande	Migratoria estival continental
<i>Calidris bairdii</i>	Playero de Baird	Migratoria estival continental
<i>Calidris alba</i>	Playero Blanco	Migratoria estival continental
<i>Arenaria interpres</i>	Playero Vuelvepedras	Migratoria estival intercontinental
<i>Vanelus chilensis</i>	Queltehue	Residente
<i>Phytotoma rara</i>	Rara	Residente
<i>Rynchops niger</i>	Rayador	Migratoria estival continental
<i>Tachuris rubrigastra</i>	Siete colores	Residente
<i>Fulica Armillata</i>	Tagua	Residente
<i>Fulica leucoptera</i>	Tagua Chica	Residente
<i>Fulica rufifrons</i>	Tagua frente roja	Residente
<i>Gallinula melanops</i>	Tagüita	Residente
<i>Mimus thenca</i>	Tenca	Residente
<i>Leptasthenura aegithaloides</i>	Tijeral	Residente
<i>Milvago chimango</i>	Tiuque	Residente
<i>Phleocryptes melanops</i>	Trabajador	Residente
<i>Agelaius thilius</i>	Trile	Residente
<i>Curaeus curaeus</i>	Tordo	Residente

<i>Columbina picui</i>	Tórtolita Cuyana	Residente
<i>Phalacrocorax olivaceus</i>	Yeco	Residente
<i>Numenius phaeopus</i>	Zarapito	Migratoria estival continental
<i>Turdus falcklandii megallanicus</i>	Zorzal	Residente

Fuente: CONAF (*) No existe información suficiente

2.6.3.2 Virus de Influenza aviar en aves silvestres

Los virus de Influenza Aviar se han aislado de más de 105 especies de aves silvestres de 26 familias diferentes (Olsen *et al.*, 2006). Las aves silvestres acuáticas migratorias, son los reservorios naturales de toda la constelación genética de los virus de influenza, en particular las especies de los órdenes Anseriformes y Passeriforme, ambas aves silvestres migratorias de lagos, y las del orden Charadriiforme (gaviotas y golondrinas marinas, entre otras), que son aves acuáticas migratorias de la costa (Dennis, 2007).

Los 16 subtipos de virus de influenza de tipo A se perpetúan en las aves silvestres acuáticas a través de un comportamiento cíclico anual (estacional) en el que intervienen numerosas especies migratorias (Pérez *et al.*, 2011).

Patrón temporal/estacional

Los estudios de patrones temporales de los VIA en aves silvestres no han sido desarrollados profundamente en Sudamérica. La vigilancia epidemiológica extensiva desarrollada en patos de América del Norte ha demostrado que las mayores prevalencias de los VIABP se observan principalmente en aves juveniles (probablemente por inexperiencia inmunológica) con un pico a principios de otoño (septiembre) antes de la migración hacia el sur (Beldomenico y Uhart, 2008). Por su parte, la estacionalidad de las infecciones en aves playeras migratorias de Norteamérica (marzo a mayo) parece ser opuesta a las observadas en patos (septiembre a diciembre) con mayores prevalencias (aproximadamente 14%) durante la primavera boreal (cuando las migratorias llegan a reproducirse) (Webster *et al.*, 2007).

2.6.3.3 Rutas de aves migratorias en el mundo

Se han descrito, en general, ocho rutas principales de migraciones para ciertas especies de aves de las cuales se definen tres para América, y por lo tanto de importancia para Chile; la ruta del Atlántico, la ruta del Mississippi o central y la ruta del Pacífico (Olsen, 2006).

Existen más de 460 especies de aves descritas en el país, las cuales 33 son migratorias boreales (SAG, 2012), es decir, se reproducen en el hemisferio norte y pasan

su periodo de descanso en el hemisferio sur, lo que se constituye en un eventual ingreso del virus a Chile (Tala, 2005). La figura 1 a continuación expone y describe las diferentes rutas migratorias de las poblaciones de aves silvestres en todo el mundo.

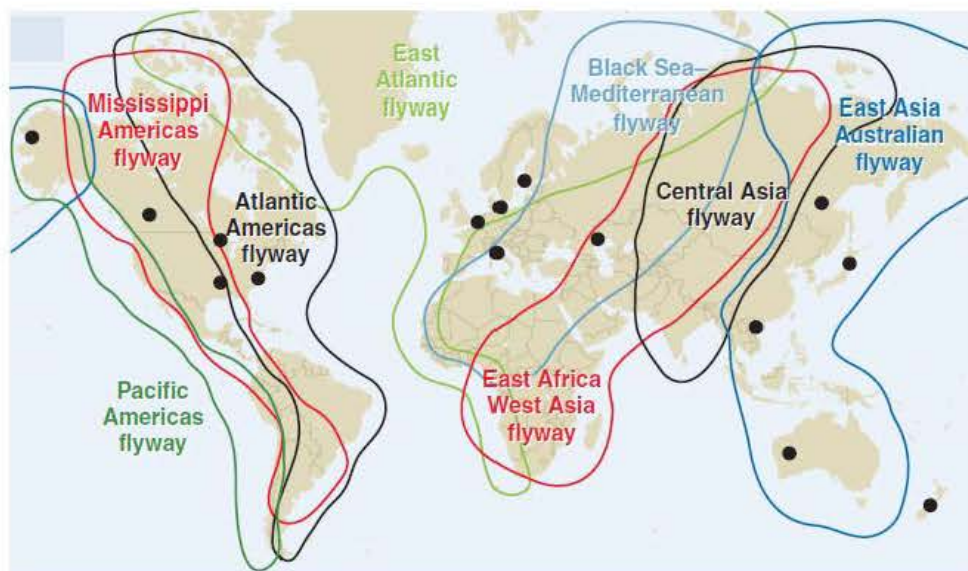


Figura 1: Rutas migratorias de las poblaciones de aves silvestres. Los puntos negros indican las ubicaciones de los centros de vigilancia histórica y actual del virus de IA. (Olsen *et al.*, 2006)

2.7 SIGNOS CLÍNICOS

La Organización Mundial de Salud Animal (OIE) determina que el período de incubación del virus es de tres a cinco días. Sin embargo, el Código Sanitario para los Animales Terrestres de la OIE menciona que puede ser más largo, siendo el tiempo máximo de 21 días (OIE, 2016a).

En aves silvestres los virus de IAAP y los virus de IABP raramente producen cuadros clínicos (García *et al.*, 2006).

2.8 VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA

La vigilancia epidemiológica de la influenza aviar, debe ser implementada en aves de corral y en aves silvestres migratorias (García *et al.*, 2006; OIE, 2008). Para la vigilancia de estas aves, se tienen en cuenta las diferentes rutas migratorias de diferentes continentes (OIE, 2008).

En Chile, la vigilancia epidemiológica de la IA está a cargo del Servicio Agrícola y Ganadero, el cual cuenta con un “Plan Anual de Vigilancia de Enfermedades”, que

contempla un programa de alcance nacional que incluye la vigilancia principalmente de enfermedades exóticas, dentro de las cuales se encuentra la influenza aviar (SAG, 2015).

2.9 INFLUENZA AVIAR EN EL MUNDO

Los virus de influenza aviar de baja patogenicidad (IABP) ocurren y están presentes en aves silvestres y de corral en todo el mundo. En cambio, los virus de influenza aviar de alta patogenicidad (IAAP) se han erradicado de las aves de corral en la mayoría de los países desarrollados (OIE, 2009).

2.9.1 Situación en América del Norte

En Norteamérica, la presencia de virus de IAAP se ha mantenido de forma intensa y persistente. A finales del año 2012 en México se generó un foco de IAAP causado por un subtipo H7N3 el cual se mantuvo activo durante todo el año 2015; en Canadá se han generado varios focos de IAAP, el más importante ha estado activo desde finales del año 2014, subtipo H5N2 (FAO, 2016). Entre los años 2014 y 2015, las autoridades de agricultura de los Estados Unidos detectaron brotes en aves domésticas y silvestres por virus re-asociados de influenza aviar H5 altamente patogénica (IAAP), los cuales fueron notificados a la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2015).

2.9.2 Situación en América del Sur

Actualmente, en América del Sur existe escasa información sobre infecciones por virus de influenza aviar en poblaciones silvestres. En Perú, se han realizado estudios en aves migratorias aislándose 7 cepas de virus de IABP del subtipo H12N5 en los humedales de Puerto Viejo, (Segovia, 2010) y 9 cepas de virus de IABP de los subtipos H3N8, H4N5, H10N9 y H13N2 en la costa central (Gherzi *et al.*, 2009).

En Bolivia durante el año 2001, se aisló un virus de influenza aviar de una Cerceta colorada (*Anas cyanoptera*) en muestras tomadas como parte de un estudio de vigilancia para la influenza. Mediante secuenciación genética se determinó que correspondía a un virus H7N3. El análisis de todos los ocho genes reveló que 5 de los genes estaban relacionados con el virus H7N3 aislado en Chile el año 2002 (Spackman *et al.*, 2007).

En Argentina la “Red de Asistencia al SENASA (Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria) para la vigilancia Epidemiológica en Aves Silvestres” procesó durante los años 2006 a 2009, hisopados cloacales provenientes de aves silvestres de 68 especies de 11 órdenes. De estos muestreos, se caracterizaron 16 muestras positivas a influenza aviar tipo A (Espinoza y Borgna, 2009).

Entre los años 2010 y 2012, en Colombia se llevó a cabo una vigilancia de influenza aviar en la llanura oriental (Los Llanos), donde a través de la técnica rRT-PCR en tiempo real se identificaron VI en aves silvestres. Se logró aislar un virus del subtipo H5N2 de dos especies residentes de patos silbadores (*Dendrocygninae*) (Karlsson, 2013).

2.9.3 Situación en Chile

Hasta al año 2017, la influenza aviar en Chile era una enfermedad de categoría “ausente”, es decir, si bien alguna vez había sido detectada en nuestro país (año 2002), en la actualidad no estaba presente en él (SAG, 2015). Este estatus sanitario se mantuvo hasta el mes de Enero del presente año (2017), donde el Servicio Agrícola y Ganadero confirmó la existencia de dos focos de IABP del subtipo H7; el primero circunscrito a un plantel de pavos de engorda, pertenecientes a la empresa Sopraval, ubicado en el sector rural de la comuna de Quilpué, en la región de Valparaíso, en donde fueron sacrificados 350.000 aves y el segundo brote se registró en una granja de pavos de engorda pertenecientes a la misma empresa, en la comuna de Los Nogales, también ubicada en la región de Valparaíso, donde fueron sacrificadas 35.000 aves (SAG, 2017).

Un estudio realizado en el humedal El Yali, ubicado en la región de Valparaíso, donde las unidades de estudio fueron los sistemas productivos de traspatio (SPT) ubicadas dentro de un radio de 3km de los límites de la reserva Nacional El Yali, las cuales fueron muestreadas en dos temporadas (primavera 2013 y otoño 2014) para sero-prevalencia del VIA, y una temporada (otoño 2014) para la prevalencia del mismo, obtuvo los siguientes resultados: de 31 SPT muestreados, el 42% fueron seropositivos a virus de IA, que aumentaron al 60% durante el muestreo de 2014, con 40 unidades de traspatio muestreadas. El 27% de los SPT fueron positivos para el ensayo de r RT-PCR para el gen M del virus de influenza A (valor CT <38). A su vez, ocho granjas (73% de los BPS positivas a rRT-PCR) también fueron positivas para la prueba de ELISA al mismo tiempo (Bravo-Vasquez *et al.*, 2016).

III.- HIPÓTESIS

En los ecosistemas de los sectores Humedal Laguna Cartagena y Reserva Nacional Lago Peñuelas, existe presencia de virus de Influenza Aviar y su prevalencia variaría en función a la estacionalidad de las comunidades de aves silvestres presentes en ambos sitios.

IV.- OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- Estimar la prevalencia de virus de Influenza Aviar en los sectores Humedal Laguna Cartagena y Reserva Nacional Lago Peñuelas, determinando una relación entre este valor y la estacionalidad de las comunidades de aves silvestres presentes en ambos sitios durante el periodo de muestreo.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar las comunidades de especies de aves silvestres presentes los sectores Humedal Laguna Cartagena y Reserva Nacional Lago Peñuelas durante los meses de muestreo.
- Estimar la prevalencia mensual de virus de Influenza aviar en los sectores Humedal Laguna Cartagena y Reserva Nacional Lago Peñuelas durante los meses de muestreo.
- Determinar la asociación entre la estacionalidad de las comunidades de aves silvestres y las variaciones de prevalencia del virus de Influenza Aviar en los sectores Humedal Laguna Cartagena y Reserva Nacional Lago Peñuelas durante los meses de muestreo.

V.- MATERIALES Y METODOS

Zona de estudio

Humedal Laguna Cartagena

El Humedal Laguna Cartagena, se ubica en el extremo norte de la ciudad de Cartagena en la Región de Valparaíso (Chile). La superficie aproximada de la laguna es de 6 hectáreas con una profundidad media de 2 metros.

Como unidad natural, la laguna es un ecosistema costero del tipo humedal, el que se forma con el agua de la desembocadura del Estero de Cartagena. Producto de esta combinación de agua de estero y mar, la Laguna es un hábitat muy especial en el que conviven una flora y fauna muy diversas.

Se encuentra en zona Mediterránea con clara influencia marítima. Se caracteriza por una estación seca prolongada y otra de corta pero con lluvias intensas y ocasionalmente neblina costera abundante. La precipitación media de este lugar es de 470 mm y la temperatura media anual es de 11,9 grados centígrados (Ilustre Municipalidad de Cartagena).

Para la realización de los muestreos dentro del Humedal Laguna Cartagena, se contó con autorización de la Ilustre Municipalidad de Cartagena.

Lago Peñuelas

El lago Peñuelas es un embalse artificial chileno que posee una superficie de 1.400 hectáreas (promedio), el cual fue creado entre los años 1895 y 1900 con el fin de abastecer de agua potable a la parte alta del gran Valparaíso. Se ubica a 19 km al sur este del puerto de Valparaíso y a unos 100 km al oeste de la ciudad de Santiago, dentro de la Reserva Nacional Lago Peñuelas.

Esta reserva posee un clima mediterráneo con influencia marítima, una temperatura promedio anual de 14°C y una precipitación media anual de 520 milímetros.

Para la realización de los muestreos dentro de la Reserva Nacional Lago Peñuelas, se contó con el apoyo y autorización de la Corporación Nacional Forestal.

5.1 METODOLOGÍA

Los trabajos de campo (muestreos) se realizaron en los sectores de la Reserva Nacional Lago Peñuelas y Humedal Laguna Cartagena, ambos ubicados en la Región de Valparaíso, Chile. Con respecto a los procedimientos de toma de muestras e identificación de aves, se realizaron de forma simultánea en cada terreno en ambos sitios, en un periodo comprendido entre Septiembre de 2015 y Agosto de 2016. Todos los terrenos se realizaron en los momentos de mayor actividad de las aves, entre las 08:30 am y las 12:00 am, siguiendo las recomendaciones de Bibby *et al.* 1993.

5.1.1 Caracterización de las comunidades de aves silvestres:

En cada trabajo de campo se llevó a cabo un conteo visual de todas las aves silvestres presentes en ambos sitios al momento del muestreo, mediante la metodología de "Muestreo mediante Puntos de conteo", los cuales fueron efectuados en las mismas áreas a abarcar durante la toma de muestras ambientales, es decir, en áreas donde se observe la mayor concentración de aves. Sin embargo, estos se efectuaron antes de la toma de muestras ambientales, con el fin de no asustar a las aves y llevar a cabo el censo de manera efectiva. Estos conteos e identificación se ejecutaron mediante binoculares por personas con capacitación en reconocimiento de aves silvestres, las cuales se encargaron de anotar en una bitácora de registros; el nombre de las especies visualizadas y el número de aves observadas por especie.

Los registros se realizaron dentro del área de una circunferencia de 25 m, registrando todos los individuos observados en esta durante un período de tiempo de aproximadamente 20 minutos por punto de conteo. Posteriormente, estos registros fueron ingresados a una planilla de datos en el programa software Excel.

- a) La diversidad mensual de especies de aves silvestres para cada sitio fue expresada a través del índice de diversidad Shannon (1949) :

$$H' = \sum p_i (\log_2 p_i)$$

Donde:

H': Índice de Diversidad de Shanon-Wiener

p_i : n_i/N_i

n_i : número de individuos de la especie i

Ni: número de todos los individuos de todas las especies.

Valores de referencia: <2 corresponden a índices bajos de biodiversidad, >2 índices medio de biodiversidad y >3 índices altos de biodiversidad.

Para medir la **equidad entre las especies** presentes por mes, se utilizó el índice de Pielou (*J*) (1969). Su valor va de 0 a 1, de forma que 1 corresponde a situaciones donde todas las especies son igual de abundantes (Pielou, 1969).

$$J = \frac{H'}{\text{Log}_2 S}$$

Donde: H' = índice de Shannon-Wiener y $\log_2 S$ = es la diversidad máxima (H'_{max})

- b) **La riqueza y la abundancia total mensual** para cada sitio se analizó utilizando la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis (Shahabuddin & Kumar 2006). También se consideró la abundancia y riqueza total como la sumatoria de todos los individuos y de las especies, respectivamente, registrados en los sitio durante los meses de muestreo.

5.1.2 Estimación de la prevalencia:

Obtención de muestras de heces:

Para los primeros muestreos en terreno se llevó a cabo un estudio piloto, con el propósito de evaluar la factibilidad *in situ* de las condiciones del terreno que permitan coleccionar el número de muestras mínimas para estimar la prevalencia de manera efectiva.

Para estimar el tamaño mínimo de muestras se utilizó la siguiente ecuación (Pita, 2001):

$$n = Z^2 pq/B^2$$

Donde n = Total de la población,

z = 1,96 para el 95% de confianza, 2,56 para el 99% (en este un 95% de confianza),

p = Frecuencia esperada del factor a estudiar (en este caso 10% = 0,1),

q = 1-p (en este caso 1-0,1 = 0,9) y,

B = Precisión o error admitido (en este caso un 5% = 0,05)

$$n = 1,96^2 * 0,1 * 0,9 / 0,05^2 = 138$$

Por lo tanto, se recolectaron un mínimo de 138 muestras de la población a estudiar por cada terreno al mes.

Al llegar a cada sitio de muestreo, se tomaron las coordenadas de la zona con un GPS. Se realizó un equipamiento previo de las personas encargadas de tomar las muestras (vestimenta adecuada (bioseguridad) y preparación de bolsos individuales con los materiales necesarios). Se colectaron muestras ambientales, específicamente de heces frescas de aves silvestres distribuidas en el suelo, con hisopos estériles, los cuales fueron introducidos en las heces, ejerciendo una leve presión. Posteriormente, los hisopos con las muestras, son introducidos en un tubo con tapa rosca y medio de transporte viral (UTM) los cuales estaban previamente etiquetados con un código alfa-numérico.

Luego, estos tubos fueron depositados en un cooler a una temperatura aproximada de 4°C, la cual fue medida con un termómetro dispuesto dentro, para su posterior transporte al laboratorio.

Análisis de la muestras en el laboratorio:

Para todos los trabajos realizados en el laboratorio, se llevó a cabo un proceso de limpieza y desinfección previo tanto de la Campana de bioseguridad como de los materiales a utilizar, acompañado de la utilización de indumentaria necesaria para el trabajo en un laboratorio.

Se descongelarán las muestras fecales, almacenadas a -80°C, para ser sometidas al proceso de extracción de RNA. De esta forma, se obtendrán purificados de RNA para ser procesados mediante el método diagnóstico basado en la Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa (rRT-PCR), el cual tiene por objetivo detectar el gen M (matriz viral) del VI tipo A. El procedimiento de extracción se realizará según los protocolos de Spackman y Lee (2014). Mientras que el ensayo rRT-PCR se llevará a cabo siguiendo las recomendaciones entregadas por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (*Centers for Disease Control and Prevention*, CDC) y la Organización Mundial de Salud (OMS).

a) Extracción de RNA y rRT-PCR en tiempo real:

Procedimientos:

- Extracción de RNA: una vez realizada la extracción, según los protocolos mencionados, se deberá resuspender el material genético en 50 µL de agua.

- Parámetros de control de calidad: se deberá contar con un control negativo propio de la extracción, también con un control negativo que cuente con el agua libre de RNAsa utilizada en el mix para la reacción del rRT-PCR y con un control positivo el cual corresponderá a un purificado de VI porcina AH1N2.
- Mix de reacción: se preparará utilizando los *primers* para detectar el gen M, siguiendo los protocolos de CDC y OMS correspondientes. Posteriormente, la reacción se llevará a cabo en el Termociclador de PCR en tiempo real (Stratagene Mx3000p) dispuesto en la Unidad de EpiFAVET.

Interpretación de resultados RRT-PCR:

Bajo la metodología previamente nombrada, se realizó una evaluación de la reacción de RRT-PCR con partidores y sonda Inf A para la detección genérica de virus de influenza A.

Luego de 40 ciclos de amplificación, las curvas obtenidas se interpretaron de la siguiente manera; Las reacciones de los controles negativos no deben exhibir curvas de amplificación de fluorescencia que crucen la línea de umbral. En caso de que ocurra un falso positivo, es posible que haya ocurrido contaminación de la muestra. Por su parte, todas las muestras que exhiban curvas de reacción que crucen la línea umbral en los primeros 38 ciclos se interpretaron como muestras positivas a RRT-PCR y todas las muestras que no exhiban curvas de reacción que crucen la línea umbral en los primeros 38 ciclos, se interpretaron como muestras negativas a RT-PCR (Karlsson *et al.*, 2013).

b) Cálculo de prevalencia:

Se estimó la prevalencia mensual otorgada por el test diagnóstico y el cálculo de intervalos de confianza para proporciones mediante el programa software Infostat.

Un estimador de intervalo de confianza de la proporción en la población P , es un intervalo, calculado a partir de los datos de la muestra, en el cual confiaremos se encuentra la proporción de la población P (Moreno *et al.*, 2000).

Se utilizó la siguiente fórmula para el cálculo de prevalencia:

$$\hat{p} = \frac{Ct}{Nt}$$

Donde: Ct = es el número de casos existentes en un momento determinado

$N\tau$ = es el número total de individuos en un momento determinado

5.1.3 Análisis de la asociación entre estacionalidad y prevalencia:

Se realizó un análisis estadístico de regresión logística univariada, la cual es una herramienta estadística muy utilizada en epidemiología veterinaria en aquellas situaciones donde el resultado del estudio es dicotómico, mayoritariamente, variables que representan presencia o ausencia de enfermedad (Dohoo *et al.*, 2003). De esta manera, la regresión logística permite cuantificar la relación entre una variable respuesta y variables explicativas (Pagano, 2012). Para una respuesta binaria, el modelo de regresión logística simple, es decir con una variable regresora, presenta la siguiente fórmula:

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

Donde p_i es la probabilidad de éxito dado X_i , α es la ordenada al origen (constante), β es la pendiente o coeficiente de regresión asociado a X y X es la variable explicatoria (estación). Luego, en regresión logística, se modela la transformación *Logit* de la probabilidad de éxito como una función lineal de una o más variables explicatorias.

VI. – RESULTADOS

6.1 Caracterización de las comunidades de aves silvestres

En la tabla 3 se detallan las fechas de la realización de los censos y toma de muestras de aves silvestres presentes en el Humedal Laguna Cartagena y la Reserva Nacional Lago Peñuelas entre los años 2015 y 2016.

Tabla 3. Fechas de los censos y toma de muestras realizados en Humedal Laguna Cartagena y Reserva Nacional Lago Peñuelas.

	Humedal Laguna Cartagena	Reserva Nacional Lago Peñuelas
Primavera 2015	25 noviembre	10 diciembre
Verano 2016	29 enero / 16 marzo	24 febrero / 15 marzo
Otoño 2016	29 abril / 31 mayo	22 abril / 27 mayo
Invierno 2016	15 agosto	24 julio

Humedal Laguna Cartagena

Se realizaron seis censos entre noviembre de 2015 y agosto de 2016, registrándose un total de 3.815 individuos pertenecientes a 39 especies, 18 familias y 9 órdenes, de las cuales 34 fueron clasificadas como especies residentes, 4 como visitantes de primavera verano y 1 como visitante de otoño invierno (Tabla 4).

Las especies residentes tuvieron mayor presencia durante todos los meses de muestreo, variando en abundancia, siendo esta mayor entre los meses de marzo a abril (25 y 24 especies respectivamente). Con respecto a las especies visitantes, se observó una presencia comparativamente constante con 3 especies en casi todos los meses, a excepción de mayo donde hubo sólo 2 (Gráfico 1) (Tabla 4).

En relación a la abundancia total de individuos, se observaron diferencias estadísticamente significativas a la prueba de Kruskal-Wallis entre la estaciones Primavera-Verano (Noviembre a Marzo) y Otoño-Invierno (Abril a Agosto) ($H= 50,78$, $P= <0,0001$). Se observó un aumento en la abundancia a fines de la época de verano, con un máximo de 1.012 individuos censados en el mes de marzo y toda la época de otoño, con un promedio de 575 individuos entre abril y mayo, mostrando un aumento del número de individuos censados en 781 durante el mes de agosto (Gráfico 1).

Con respecto a la proporción en abundancia de individuos residentes y visitantes obtenida para el sitio, se puede observar que los primeros (residentes) fueron más abundantes en la mayoría de los meses, a excepción de Noviembre, donde la proporción de visitantes fue mayor que los residentes (Gráfico 2).

Gráfico 1. Abundancia comparativa entre especies de aves silvestres residentes y visitantes y abundancia total de individuos censados por mes en el Humedal Laguna Cartagena.

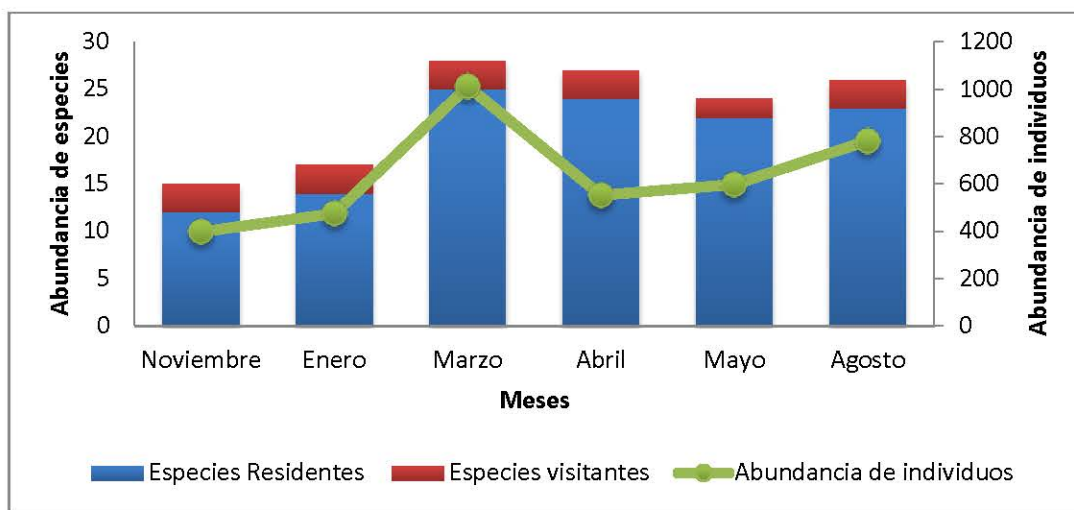
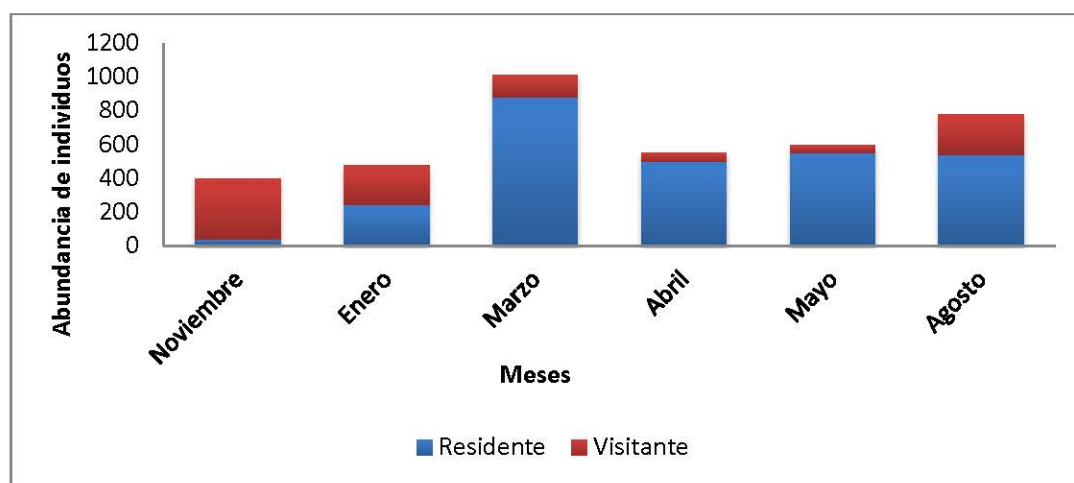


Grafico 2. Abundancia comparativa entre individuos pertenecientes a especies visitantes y especies residentes censados por mes en el Humedal Laguna Cartagena.



La composición del ensamble de aves fue la siguiente; se observó una dominancia de la familia Anatidae (diez especies), siguiéndole en importancia las familias Rallidae (cinco especies), y Laridae y Ardeidae (cuatro especies).

Los individuos del orden Charadriiformes fueron los más abundantes durante todos los meses de muestreos con una presencia del 48%, seguido por el orden Gruiformes con un 13% y Anseriformes con un 9%. La tabla 4 muestra las frecuencias absolutas (*fa*) y relativas (*fr*) de las especies de aves silvestres residentes y visitantes registradas durante los meses de muestreos en el Humedal Laguna Cartagena.

Tabla 4. Frecuencias absolutas y frecuencias relativas de individuos censados por especies de aves silvestres residentes y visitantes identificadas en Humedal Laguna Cartagena entre noviembre de 2015 y agosto de 2016.

Especie	MESES												E
	Noviembre		Enero		Marzo		Abril		Mayo		Agosto		
	fa	fr	Fa	Fr	fa	fr	Fa	fr	Fa	fr	Fa	Fr	
<i>Agelasticus thilius thilius</i>	4	0,01	2	0,004	-	-	-	-	-	-	3	0,004	R
<i>Anas cyanoptera cyanoptera</i>	-	-	-	-	3	0,002	10	0,02	12	0,02	14	0,02	R
<i>Anas georgica spinicauda</i>	10	0,02	-	-	27	0,02	65	0,1	63	0,1	36	0,05	R
<i>Anas flavirostris flavirostris</i>	-	-	-	-	-	-	6	0,01	1	0,002	-	-	R
<i>Anas plataea</i>	9	0,02	-	-	12	0,01	4	0,01	2	0,003	22	0,03	R
<i>Anas sibilatrix</i>	-	-	-	-	5	0,004	3	0,005	6	0,01	10	0,01	R
<i>Ardea alba egretta</i>	-	-	1	0,002	1	0,001	2	0,004	-	-	-	-	R
<i>Ardea cocoi</i>	-	-	-	-	-	-	1	0,002	1	0,002	-	-	R
<i>Cairina moschata</i>	-	-	2	0,004	2	0,002	2	0,004	2	0,003	2	0,003	R
<i>Cathartes aura jota</i>	-	-	-	-	-	-	6	0,01	-	-	-	-	R
<i>Chroicocephalus maculipennis</i>	-	-	121	0,2	82	0,08	17	0,03	31	0,05	148	0,2	V
<i>Cinclodes patagonicus patagonicus</i>	-	-	-	-	18	0,01	-	-	-	-	-	-	R
<i>Coscoroba coscoroba</i>	2	0,005	-	-	4	0,003	7	0,01	2	0,003	2	0,003	V
<i>Cygnus melanocoryphus</i>	28	0,07	-	-	22	0,02	4	0,007	3	0,0050	1	0,001	R
<i>Egretta thula thula</i>	1	0,002	12	0,02	1	0,001	13	0,02	14	0,02	2	0,05	R
<i>Fulica armillata</i>	6	0,01	166	0,3	179	0,1	79	0,1	42	0,07	42	0,05	R
<i>Fulica leucoptera</i>	-	-	-	-	8	0,007	-	-	-	-	-	-	R
<i>Fulica rufifrons</i>	-	-	-	-	4	0,003	-	-	-	-	-	-	R
<i>Gallinula melanops</i>	-	-	2	0,004	1	0,001	5	0,01	5	0,01	1	0,001	R

<i>crassirostris</i>													
<i>Haematopus palliatus palliatus</i>	2	0,005	10	0,02	3	0,002	67	0,1	41	0,07	51	0,07	R
<i>Himantopus mexicanus melanurus</i>	12	0,03	12	0,02	61	0,06	11	0,02	16	0,03	44	0,06	R
<i>Heteronetta atricapilla</i>	-	-	-	-	12	0,01	3	0,01	7	0,01	5	0,006	R
<i>Larus dominicanus dominicanus</i>	-	-	7	0,01	509	0,5	103	0,2	196	0,3	308	0,4	R
<i>Leucophaeus modestus</i>	-	-	-	-	4	0,003	36	0,07	50	0,08	-	-	R
<i>Leucophaeus pipixcan</i>	18	0,04	64	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-	V
<i>Milvago chimango chimango</i>	-	-	-	-	2	0,002	21	0,04	1	0,002	1	0,001	R
<i>Numenius phaeopus hudsonicus</i>	300	0,7	44	0,9	4	0,003	-	-	-	-	58	0,07	V
<i>Nycticorax nycticorax obscurus</i>	-	-	3	0,006	-	-	-	-	-	-	-	-	R
<i>Oxyura sp</i>	-	-	2	0,004	12	0,01	-	-	-	-	6	0,008	R
<i>Passer domesticus domesticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0,003	R
<i>Phalacrocorax brasilianus brasilianus</i>	-	-	19	0,04	23	0,02	49	0,09	86	0,1	7	0,009	R
<i>Podiceps major major</i>	-	-	-	-	-	-	2	0,004	4	0,01	4	0,005	R
<i>Podiceps occipitalis occipitalis</i>	-	-	-	-	1	0,001	-	-	-	-	-	-	R
<i>Rollandia rolland chilensis</i>	1	0,002	3	0,006	8	0,007	7	0,01	6	0,01	-	-	R
<i>Sturnella loyca loyca</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0,004	R
<i>Tachycineta meyeri</i>	1	0,002	5	0,01	1	0,001	13	0,02	2	0,003	2	0,003	R
<i>Thalasseus elegans</i>	-	-	-	-	-	-	14	0,03	-	-	-	-	V
<i>Vanellus chilensis chilensis</i>	3	0,007	-	-	3	0,002	2	0,004	4	0,007	6	0,008	R
<i>Zonotrichia capensis chilensis</i>	1	0,002	-	-	-	-	-	-	-	-	1	0,001	R
TOTAL	398		475		1012		552		597		781		

*E: estatus R: residente V: visitante

En cuanto a al índice de diversidad de especies Shannon-Wiener, se obtuvieron resultados bajos (<2) los meses de noviembre, enero y marzo, mientras que los meses de abril, mayo y agosto se obtuvieron índices medios de diversidad (2 a 3) (Shannon-Wiener, 1949) (Tabla 2). Estas diferencias de diversidad resultaron estadísticamente significativas entre los meses correspondientes a Primavera-Verano vs Otoño-Invierno ($H= 812,43$, $P= <0,0001$). Por su parte, los índices de equidad Pielou (J') calculados, manifiestan que el mes con menor equidad entre sus especies es noviembre, en contraste con abril el cual presenta una alta equidad obteniendo un índice con un valor muy cercano a 1 (Pielou, 1969) (Tabla 5).

Tabla 5. Índices de diversidad de *Shannon-Wiener* (H') y de equidad de *Pielou* (J') en los distintos meses de muestreo para las aves silvestres presentes en el Humedal Laguna Cartagena.

	Índice <i>Shannon-Wiener</i>	Índice de <i>Pielou</i>
Noviembre	1,083	0,4
Enero	1,881	0,7
Marzo	1,821	0,5
Abril	2,617	0,8
Mayo	2,339	0,7
Agosto	2,073	0,6

Reserva Nacional Lago Peñuelas

Se realizaron seis censos entre diciembre de 2015 y julio de 2016 (Tabla 3), registrando un total de 1.276 individuos pertenecientes a 24 especies, 14 familias y 10 órdenes, de las cuales 20 fueron clasificadas como especies residentes, 3 como visitantes de primavera verano y 1 como visitante de otoño invierno (Tabla 6).

La proporción de especies residentes fue superior durante todos los meses de muestreo, variando en abundancia, siendo mayor en los meses diciembre, febrero y marzo (11, 11 y 12 especies respectivamente) y menor en el mes de julio (3 especies). Con respecto a las especies visitantes, se observó una presencia constantemente baja, con un máximo de 2 especies identificadas en los meses de abril y mayo, y con un mínimo de cero especies en los meses de marzo y julio (Gráfico 2).

En relación a la abundancia total de individuos, no se observaron diferencias estadísticamente significativas a la prueba de Kruskal-Wallis entre las estaciones Primavera-Verano y Otoño-Invierno ($H= 1,54$, $P=0,2086$). Sin embargo, los resultados obtenidos fueron diversos y no constantes, manifestando que los meses con valores más

altos fueron diciembre con 456 individuos censados y mayo con 239, por su parte, el mes con menor cantidad de individuos censados fue Julio con solo 14 (Gráfico 3).

Con respecto a la proporción de individuos residentes y visitantes obtenida para el sitio, se puede observar que al igual que en el HLC, los individuos residentes fueron los más abundantes en la mayoría de los meses, a excepción de Diciembre, donde la proporción de visitantes fue mayor que los residentes (Gráfico 4).

Gráfico 3. Abundancia comparativa entre especies de aves silvestres residentes y visitantes y abundancia total de individuos censados por mes en La Reserva Nacional Lago Peñuelas.

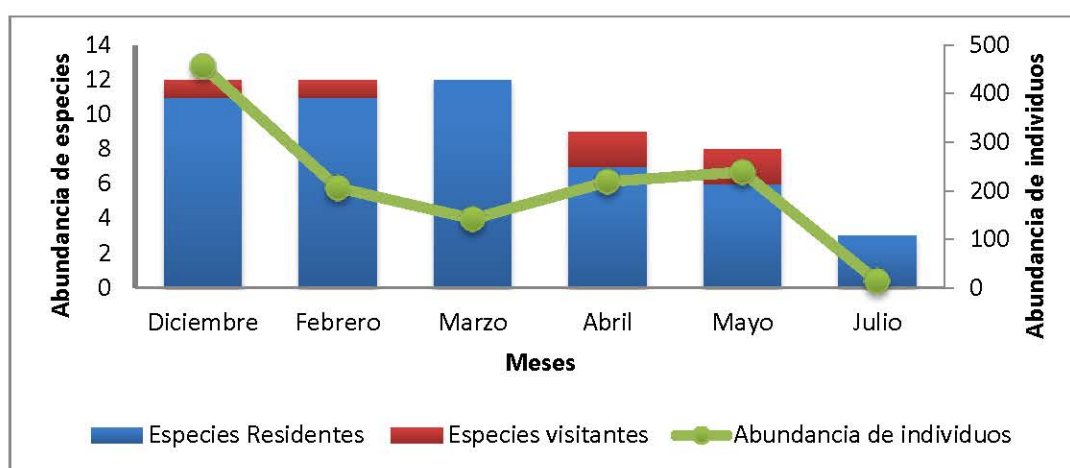
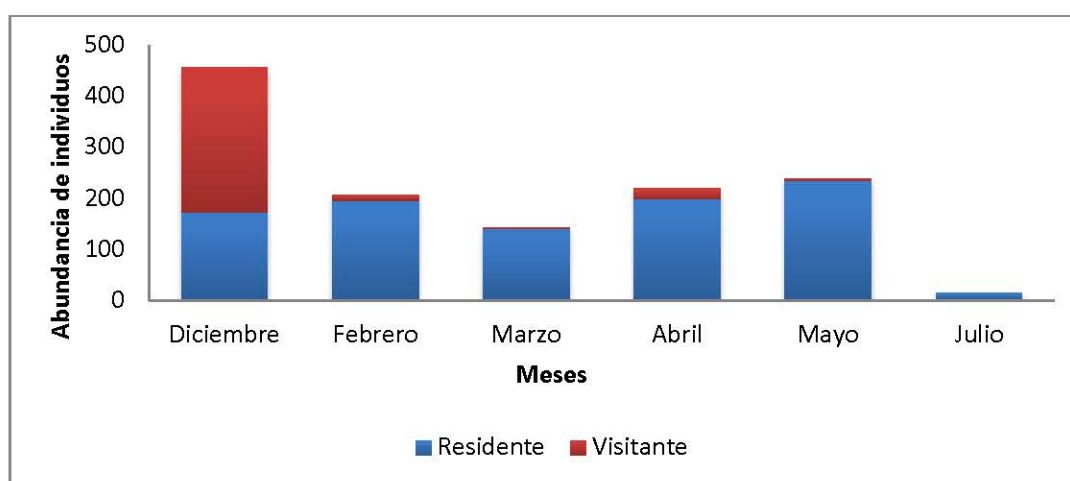


Grafico 4. Abundancia comparativa entre individuos pertenecientes a especies visitantes y especies residentes censados por mes en la Reserva Nacional Lago Peñuelas.



La composición del ensamble de aves fue la siguiente; se observó una dominancia de las familias Anatidae y Laridae (5 especies), siguiéndole en importancia la familia Ardeidae (3 especies).

Los individuos del orden Charadriiformes fueron los más abundantes con una presencia del 68%, seguido por el orden Anseriformes con un 15% y por el orden Suliformes con un 8%. La tabla 6 muestra las frecuencias absolutas (fa) y relativas (fr) de las especies de aves silvestres residentes y visitantes registradas durante los meses de muestreos en la Reserva Nacional Lago Peñuelas.

Tabla 6. Frecuencias absolutas y frecuencias relativas de individuos censados por especies de aves silvestres residentes y visitantes identificadas en la Reserva Nacional Lago Peñuelas entre diciembre de 2015 y julio de 2016.

Especie	MESES												E
	Diciembre		Febrero		Marzo		Abril		Mayo		Julio		
	fa	Fr	fa	fr	Fa	fr	fa	fr	fa	fr	fa	Fr	
<i>Anas flavirostris flavirostris</i>	-	-	1	0,005	2	0,01	-	-	-	-	-	-	R
<i>Anas georgica spinicauda</i>	121	0,3	51	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-	R
<i>Anas sibilatrix</i>	2	0,004	7	0,03	-	-	-	-	-	-	-	-	R
<i>Ardea alba egretta</i>	4	0,01	4	0,02	13	0,1	1	0,005	-	-	1	0,07	R
<i>Ardea cocoi</i>	6	0,01	2	0,01	2	0,01	-	-	-	-	2	0,1	R
<i>Anas sp*</i>	-	-	-	-	5	0,04	-	-	-	-	-	-	R
<i>Charadrius collaris</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0,01	-	-	V
<i>Chroicocephalus maculipennis</i>	-	-	3	0,01	-	-	17	0,08	2	0,01	-	-	V
<i>Coragyps atratus foetens</i>	1	0,002	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0,1	R
<i>Cygnus melanocoryphus</i>	1	0,002	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R
<i>Egretta thula thula</i>	9	0,02	1	0,005	7	0,05	-	-	-	-	-	-	R
<i>Fulica armillata</i>	6	0,01	-	-	-	-	9	0,04	-	-	-	-	R
<i>Geranoaetus polyosoma polyosoma</i>	-	-	-	-	1	0,01	-	-	-	-	-	-	R
<i>Himantopus mexicanus melanurus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	0,1	R
<i>Larus dominicanus dominicanus</i>	-	-	103	0,5	81	0,6	140	0,6	170	0,7	-	-	R

<i>Leucophaeus modestus</i>	-	-	-	-	1	0,007	-	-	-	-	-	-	R
<i>Leucophaeus pipixcan</i>	280	0,6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V
<i>Milvago chimango chimango</i>	-	-	2	0,01	2	0,01	7	0,03	2	0,01	-	-	R
<i>Phalacrocorax brasilianus brasilianus</i>	5	0,01	3	0,01	10	0,07	31	0,1	55	0,2	-	-	R
<i>Podiceps major major</i>	10	0,02	7	0,03	-	-	5	0,02	1	0,004	-	-	R
<i>Rynchops niger cinerascens</i>	-	-	-	-	-	-	4	0,02	-	-	-	-	V
<i>Tachycineta meyeri</i>	-	-	-	-	7	0,05	-	-	2	0,01	-	-	R
<i>Thinocorus rumicivorus rumicivorus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	0,2	R
<i>Vanellus chilensis chilensis</i>	11	0,02	22	0,1	11	0,08	5	0,02	4	0,02	4	0,3	R
TOTAL	456		206		142		219		239		14		

*E: estatus R: residente V: visitante

En cuanto a los índices de diversidad de especies Shannon-Wiener, todos los meses censados obtuvieron índices bajos (<2), dentro de los cuales, el más cercano a presentar una diversidad media, fue julio con un índice de 1,7 (Shannon-Wiener, 1949) (Tabla 3). Sin embargo, los índices obtenidos resultaron estadísticamente significativos entre las estaciones Primavera-Verano vs Otoño-Invierno ($H= 17,52$, $P= <0,0001$). Con respecto a los índice de equidad de Pielou (J') calculados, casi todos los meses presentaron una equidad media entre sus especies, a excepción de julio, el cual presentó una equidad máxima con un valor de 1 (Pielou, 1969) (Tabla 3).

Tabla 7. Índices de diversidad de *Shannon-Wiener* (H') y de equidad de *Pielou* (J') en los distintos meses de muestreo para las aves silvestres presentes en la Reserva Nacional Lago Peñuelas.

	Índice <i>Shannon-Wiener</i>	Índice de <i>Pielou</i>
Diciembre	1,158	0,5
Febrero	1,502	0,6
Marzo	1,588	0,6
Abril	1,272	0,6
Mayo	0,846	0,4
Julio	1,710	1

6.2 Estimación de prevalencia

Humedal Laguna Cartagena

De un total de 1.147 muestras de heces de aves silvestres recolectadas entre septiembre de 2015 y agosto de 2016 y al ser analizadas mediante la técnica de rRT-PCR en tiempo real, cinco exhibieron curvas de reacción que cruzaron la línea umbral antes de los 38 ciclos, siendo positivas al gen de matriz (M) de virus de influenza tipo A, arrojando así una prevalencia total de 0,4%.

A continuación (tabla 6) se presentan los resultados del presente estudio detallando; el número total de muestras analizadas, muestras positivas a rRT-PCR y prevalencias calculadas para cada mes en el HLC.

Tabla 8. Resultados de muestras analizadas mediante la prueba rRT-PCR pertenecientes a aves silvestres presentes en el Humedal Laguna Cartagena entre septiembre de 2015 y agosto de 2016.

Mes	N° muestras analizadas	N° muestras positivas rRT-PCR	Prevalencia (%)	Intervalos de confianza 95%
Septiembre	60	0	0	-
Noviembre	128	0	0	-
Enero	192	4	2,0	(0,02 – 3,9)
Marzo	192	1	0,5	(0,4 – 1,5)
Abril	192	0	0	-
Mayo	192	0	0	-
Agosto	192	0	0	-
TOTAL	1.148	5	-	-

Reserva Nacional Lago Peñuelas

De un total de 1.431 muestras de heces de aves silvestres recolectadas entre septiembre de 2015 a julio de 2016 y al ser analizadas mediante la técnica de rRT-PCR en tiempo real para este sitio, 15 exhibieron curvas de reacción que cruzaron la línea umbral antes de los 38 ciclos, resultando ser positivas al gen de matriz (M) de virus de influenza tipo A, arrojando así una prevalencia total de 1,04%.

A continuación (tabla 7) se presentan los resultados del presente estudio detallando; el número total de muestras analizadas, muestras positivas a rRT-PCR y prevalencias calculadas para cada mes en la RNLP.

Tabla 9. Resultados de muestras analizadas mediante la prueba rRT-PCR pertenecientes a aves silvestres presentes en la Reserva Nacional Lago Peñuelas entre septiembre de 2015 y julio de 2016.

Mes	N° muestras analizadas	N° muestras positivas rRT-PCR	Prevalencia (%)	Intervalos de confianza 95%
Septiembre	220	3	1,4	(0,1 – 2,8)
Octubre	100	0	0	-
Diciembre	151	4	2,6	(0,06 – 5)
Febrero	192	2	1	(0,4 – 2,4)
Marzo	192	4	2	(0,02 – 4)
Abril	192	2	1	(0,4 – 2,4)
Mayo	192	0	0	-
Julio	192	0	0	-
TOTAL	1.431	15		

6.3 Asociación entre estacionalidad y prevalencia

Para el presente estudio, se utilizaron los datos obtenidos en el segundo objetivo para definir la variable dependiente para ambos sitios, definida como “Positividad a Influenza” codificada en un resultado dicotómico (Positivo = 1, Negativo = 0). De igual manera, se utilizaron los datos obtenidos en el primer objetivo para establecer las variables independientes (explicatorias), una de ellas regresora, correspondientes a “Diversidad” y dos de clasificación codificadas en un resultado dicotómico correspondientes a; “Abundancia de Individuos” (Alta y Baja) y “Estación del año” (Primavera-Verano y Otoño-Invierno). Todas las variables fueron analizadas mediante regresión logística simple, considerando una significancia estadística de $p < 0,05$ (tabla 9 y 10).

La definición y clasificación de las variables independientes consideradas en el análisis de regresión logística simple realizada para ambos sitios, se detallan en la tabla 10.

Tabla 10. Variables consideradas en el análisis de regresión logística simple para ambos sitios.

Variable	Definición y Clasificación
Diversidad	Índice de <i>Shannon-Wiener</i> calculado para cada mes. Carácter numérico.
Abundancia de individuos	Abundancia absoluta de individuos para cada mes. HLC = < o = 500 Baja y >500 Alta RNLP = < o = 200 Baja y >200 Alta
Estación del año	Meses en los cuales se realizaron los muestreos. Diciembre a Marzo = Primavera-Verano. Abril a Julio = Otoño-Invierno.

Tabla 11. Resultados de Regresión Logística Simple para asociación entre positividad a Influenza y estacionalidad de ensambles de aves silvestres en el HLC.

Variable	O.R	I.C.I	I.C.S	Valor de <i>p</i>
Diversidad	0,49	0,08	3,04	0,4434
Abundancia de individuos	9,71	1,08	87,21	0,0424
Estación del año	-	-	-	0,9870

La variable abundancia de individuos para el HLC presentó un valor de $p = 0,0424$ y un OR de 9,71; indicando que los meses que presentan una abundancia de individuos baja tendrían un riesgo 9,71 veces mayor de ser positivos a VIA que aquellos que presentan una abundancia alta de aves. No se encontró asociación estadística en las otras variables analizadas.

La variable estación del año para la RNLP presentó un valor de $p = 0,0288$ y un OR de 5,47; indicando que las aves que fueron muestreadas durante la época de primavera-verano tendrían un riesgo 5,47 veces mayor de ser positivas a VIA que aquellas muestreadas durante la época de otoño-invierno. No se encontró asociación estadística en las otras variables analizadas (tabla 12).

Tabla 12. Resultados de Regresión Logística Simple para asociación entre positividad a Influenza y estacionalidad de ensambles de aves silvestres en la RNLP.

Variable	O.R	I.C.I	I.C.S	Valor de <i>p</i>
Diversidad	1,35	0,18	9,80	0,7693
Abundancia de individuos	0,95	0,28	3,16	0,9282
Estación del año	5,47	1,19	25,07	0,0288*

* Variables que presentaron significancia estadística ($p < 0,05$).

VII. – DISCUSIÓN

7.1 Caracterización de las comunidades de aves silvestres

En Chile central existe una compleja red de humedales que alberga una gran diversidad de aves acuáticas (Vilina y Cofré 2006).

Los humedales de tipo estuarino, como es el caso del Humedal Laguna Cartagena, se caracterizan por una gran diversidad de condiciones ambientales dado que representan zonas ecotonales entre el agua salada del mar y el agua dulce de ríos. Esta característica junto a su alto dinamismo, influencia la estructura comunitaria de aves acuáticas, y les permite mantener una alta diversidad de especies con distintos requerimientos ecológicos (Ravenscroft y Beardall 2003). A pesar de que este humedal está sometido a una elevada presión humana, ya que está inserto en un área densamente poblada, a la fecha se han registrado en él, alrededor de 96 especies de aves, entre acuáticas, marinas y migratorias (Ilustre Municipalidad de Cartagena), de las cuales 39 fueron identificadas en este estudio (41%), sin perjuicio de que sin una corrección por esfuerzo de muestreo no es posible hacer una comparación detallada.

Por su parte, una de las características sobresalientes de la Reserva Nacional Lago Peñuelas desde el punto de vista faunístico, es que constituye la única área de concentración de avifauna de importancia entre la Región Metropolitana y la Quinta Región, llegando a contabilizarse más de 115 especies de aves (CONAF, 1999); de estas 24 fueron identificadas en este estudio (21%). Es importante destacar, que este embalse cuenta con una superficie aproximada de 522 ha, por lo cual, la dispersión de los ensambles de aves que allí habitan es muy extensa, razón por lo cual se requeriría de un mayor esfuerzo de muestreo para lograr un resultado aún más representativo.

Existen diferentes aproximaciones para obtener información sobre la presencia y abundancia de las poblaciones de aves silvestres. La más directa consiste en contar todos los individuos de una población mediante un censo (De la Maza y C. Bonacic, 2013). El muestreo mediante puntos de conteo (realizado en este estudio) se utiliza comúnmente para aves u otra taxas en que el hábitat utilizado es más cerrado, por lo que se requiere de una mayor concentración para los registros. Con respecto a las ventajas de este método, se destacan que al no estar en movimiento, el observador se concentra totalmente en los registros y que al permanecer en un lugar fijo, existe una mayor probabilidad de registrar las especies crípticas (que se mueven poco o son poco visibles).

Por otra parte, las desventajas de este método apuntan a que el tiempo de muestreo es poco eficaz, puesto que el área cubierta es menor que con los transectos y que a su vez, existe una mayor probabilidad de recontar a un mismo individuo dentro del mismo punto (De la Maza y C. Bonacic, 2013). Este estudio detectó diferencias entre los meses tanto en abundancia como de riqueza en ambos sitios, las cuales sin embargo, no resultaron ser estadísticamente significativas. Por su parte, los análisis de diversidad (H') y equidad (J') realizados, indican que tanto el HLC como la RNLP mantienen poblaciones de aves que son dominantes en términos de abundancia, correspondientes para el caso del HLC a: Taguas (*Fulica armillata*) especie residente, y la más conocida y abundante de las especies de Taguas que se encuentran en nuestro país, y las cuales gustan de aguas libres al centro y vegetación en las orillas; Gaviota Dominicana (*Larus dominicanus dominicanus*) especie residente, es la gaviota más grande de Sudamérica, con una notable zona de distribución; Zarapito (*Numenius phaeopus hudsonicus*), altamente migratoria, llega a Chile en primavera-verano (austral) pudiéndose ver a veces en bandadas bastantes numerosas en la arena húmeda buscando su alimento (Jaramillo, 2004). Para el caso de la RNLP; Yeco (*Phalacrocorax brasilianus brasilianus*) especie residente, que posee una gran capacidad de adaptación, ya que vive indistintamente tanto en agua dulce de ríos y lagos, como en las saladas de mares, sin embargo, tiende a preferir los lagos y lagunas de interior; Gaviota Dominicana (*Larus dominicanus dominicanus*) (Jaramillo, 2005). La alta representatividad numérica de individuos pertenecientes a estas especies por sobre otras, explicaría las diferencias en los valores de diversidad y equidad entre los meses para ambos sitio. Sin embargo, específicamente los índices de diversidad (H') calculados para el HLC en comparación con los calculados para la RNLP fueron mayores en todos los meses censados.

La migración en las aves es un fenómeno biológico con fuertes implicaciones fisiológicas. Se destacan cambios en la alimentación, cambios musculares, y una serie de cambios hormonales (Villaseñor, 1994). En términos generales, el proceso de migración en aves involucra un comportamiento altamente especializado y una fisiología caracterizada por dos estados: Pre-migratorio y Migratorio (Dingle, 1980). En el primero, las aves se vuelven hiperfágicas (incrementando su alimentación hasta un 50% por encima de los niveles normales y acumulando el exceso en lípidos que servirán como recursos energéticos durante la migración. En el segundo estados, el ave comienza y mantiene el vuelo migratorio, lo que implica una alta actividad catabólica (Villaseñor, 1994).

La presencia de especies visitantes se mostró muy diferente en ambos sitios. El HLC mostró un número más bien constante de estas y no evidenció diferencias entre los meses, lo cual se puede deber a que algunas especies como *Chroicocephalus maculipennis* (Gaviota cahuil) (visitante estival), *Numenius phaeopus hudsonicus* (Zarapito) (visitante estival) y *Coscoroba coscoroba* (Cisne coscoroba) (visitante invernal) tuvieron presencia en la mayoría de los meses de muestreo, lo que indicaría que estas especies mantienen individuos durante todo el año en la zona, algo que ha sido observado también en algunas zonas costeras del país (Martínez y González 2005, Jaramillo 2005). Sin embargo, y a pesar de que no podemos asegurar que todas las visitantes identificadas sean migratorias, al comparar los resultados de este estudio con los resultados de la recopilación de avistamientos de aves en la Laguna Cartagena y el Estero San Sebastián realizada por Schmitt (2009), podemos certificar que la presencia de la mayoría de las aves visitantes identificadas no es casual, ya que su abundancia es definida en la categoría de "común", a excepción de *Thalasseus elegans* que es catalogado como "raro" (Schmitt, 2009, datos no publicados) y que en nuestro estudio solo se identificó su presencia en el mes de abril y con una frecuencia relativa baja.

Por su parte, y en contraste con lo observado en el HLC, la presencia de especies visitantes en la RNLP fue muy escasa en todos los meses censados. Esto puede ser atribuido principalmente a que durante el periodo de muestreo, las precipitaciones fueron en general, entre 30% y 60% bajo el promedio en la zona centro y sur de Chile (OMM, 2016), por lo cual, es importante recalcar que este lago artificial no recibe ningún afluente y se alimenta solo por aguas lluvias (CONAF, datos no publicados), lo que provocarían una reducción en la disponibilidad y/o calidad de sus recursos junto con la disminución de la superficie del agua, produciendo el desplazamiento de individuos hacia otros humedales (Ma *et al.* 2004). Junto con esto, se ha demostrado que la gran mayoría de las especies de aves acuáticas migratorias de origen boreal, se asocian más frecuentemente a humedales costeros que a humedales interiores (Vilina & Cofré 2006), lo que explicaría la ausencia de individuos de la especie *Numenius phaeopus hudsonicus* (zarapito) en la RNLP y en comparación a la alta abundancia de estos mismos en el HLC.

Con respecto a la abundancia total de individuos, si bien ninguno de los dos sitios obtuvo diferencias estadísticamente significativas entre los meses de muestreo, se evidencia un comportamiento de los valores muy distintos al comparar ambos sitios.

Para el caso del HCL, se observa un aumento evidente en el mes de marzo (a fines de verano) y constante en los meses de abril, mayo y agosto (otoño-invierno), resultados que coinciden en parte con los obtenidos a partir de la ejecución de los censos de aves acuáticas realizados en todo el territorio nacional entre los años 2011 y 2012, los cuales determinan un incremento en la abundancia absoluta de aves en las temporadas de invierno y primavera (SAG, 2012). Escenario muy distinto al observado en la RNLP, donde se observaron valores muy inconstantes, y que no parecen seguir ningún patrón estacional, con un peak en el mes de diciembre, disminuyendo a la mitad en los meses de febrero y marzo. Posteriormente presenta un leve aumento entre abril y mayo, para finalmente volver disminuir drásticamente en julio, con solo 14 individuos censados. La marcada variabilidad de las comunidades de aves que habitan en este lago, podría responder a dos factores principales; en enero de 2015 se registró en este sitio un incendio forestal que se propagó por una superficie aproximada de 60 hectáreas de pastizal, matorral y arbolado nativo (CONAF, datos no publicados), debido a esto, se sabe que el fuego es el mayor agente de perturbación en muchos ecosistemas, debido a la pérdida de hábitat que se produce (Brotons *et al.*, 2005). Para el caso de las aves, la respuesta a la modificación del hábitat depende de los atributos de cada especie, pudiendo algunas no ser afectadas o incluso ser beneficiadas (Lantschner y Rusch 2007), tal como lo comprobaron Grigera y Pavic (2007), en un estudio realizado en el parque Nacional Nahuel Huapi, Argentina, donde reportaron que las especies que se alimentan en el suelo respondían positivamente a la perturbación producida por el incendio, observando una mayor diversidad de aves en los sitios quemados que en los no quemados. Por otra parte, las variaciones en función de las precipitaciones y la temperatura registradas en este sitio, podrían influir nuevamente y en gran parte en la disponibilidad de alimento de aves herbívoras, lo que explicaría la disminución en la abundancia, en particular de patos (*Anas spp*) y taguas (*Fulica spp*) (Lake, 2011).

En términos de relacionar los resultados obtenidos por los censos, con el potencial riesgo de entrada de VIA a nuestro país, la presencia de especies como *Charadrius collaris* (Chorlo de collar), *Leucophaeus pipixcan* (Gaviota de Franklin), *Numenius phaeopus hudsonicus* (Zarapito) y *Thalasseus elegans* (Gaviotín elegante) jugarían un rol significativo, ya que estas corresponden a especies migratorias inter-hemisféricas, que durante el invierno boreal viajan a las costas de nuestro país, desde lugares como el centro-oeste de Norteamérica (*Leucophaeus pipixcan*), Alaska y Canadá (*Numenius phaeopus hudsonicus*) y México (*Charadrius collaris* y *Thalasseus elegans*), zonas

geográficas donde actualmente existen casos confirmados de VIA en aves silvestres (OIE, 2017). Las aves migratorias pueden transportar agentes patógenos a través de largas distancias, especialmente aquellos que no afectan en gran medida su estado de salud (Olsen *et al.*, 2006). Sumado a esto, es importante destacar que las cuatro especies nombradas anteriormente pertenecen al orden Charadriiformes, las cuales se consideran, con particular importancia, como reservorios naturales de los VIA junto con las pertenecientes al orden Anseriformes (Olsen *et al.*, 2006).

7.2 Estimación de prevalencia

Los dos brotes IAAP del subtipo H7N3 ocurridos en la región de Valparaíso en nuestro país el año 2002, sumado al número de casos confirmados por la FAO y la OIE de presencia de VIA en aves silvestres en países de Norteamérica en los últimos años, hicieron justificable en este estudio la realización de muestreos en sitios donde se concentran poblaciones de aves silvestres migratorias y residentes en Chile central, específicamente en la región de Valparaíso, que albergan una gran diversidad de especies de aves, como son la Reserva Nacional Lago Peñuelas y el Humedal Laguna Cartagena. Asimismo, este estudio forma parte de un estudio más amplio de vigilancia de los VIA en aves silvestres en todo el territorio nacional.

Las aves silvestres, específicamente las especies pertenecientes al orden Anseriformes (p. ej. patos, gansos y cisnes) y al orden Charadriiformes (p. ej. gaviotas y aves playeras), se consideran los reservorios naturales de los 144 subtipos de virus de influenza aviar descritos (Webster *et al.*, 1992, Stallknecht y Brown, 2008). Estos virus, son generalmente transmitidos por las aves acuáticas a través del tracto intestinal y el virus viable se puede detectar en las heces (Webster *et al.*, 1978).

Los análisis de heces del hábitat de aves acuáticas, como es el caso del presente estudio, pueden proporcionar evidencia de la presencia y circulación de VIA en las poblaciones de aves silvestres, los subtipos específicos presentes, los niveles de patogenicidad y los posibles riesgos para las aves de corral y el ganado susceptible (Franklin *et al.*, 2009).

Para el presente estudio se decidió utilizar la técnica de rRT-PCR en tiempo real para la detección de virus de influenza tipo A, ya que este método presenta los valores más altos de sensibilidad y especificidad para su detección en comparación con otros

(Cattoli *et al.*, 2004; OIE, 2015), además de ser una alternativa rápida, y debido a que el producto rRT-PCR se detecta con una sonda específica, hay confirmación de que se amplificó el gen objetivo correcto, reduciendo así la posibilidad de falsos positivos (Spackman *et al.*, 2002).

Los resultados obtenidos revelan que para el HLC y de un total de 1.147 muestras de heces recolectadas y posteriormente analizadas, cinco de ellas resultaron positivas a rRT-PCR, obteniendo así una prevalencia del 0,4% para este sitio. De la misma forma para la RNLP y de un total de 1.431 muestras recolectadas y posteriormente analizadas, 15 de ellas fueron positivas a rRT-PCR, obteniendo así una prevalencia del 1,04%.

Al comparar estos resultados con los reportados en otros estudios, podemos comprobar que los valores calculados son muy cercanos (Olsen *et al.*, 2006), ya que se ha reportado que en Norteamérica y Canadá los valores de prevalencia encontrados para poblaciones de patos y gansos silvestres se encuentran en un rango de 0,25 – 2.0%. Otro estudio realizado en aves silvestres de humedales en México (Soriano, 2009) obtuvo 15 muestras positivas a rRT-PCR de un total de 4.694, alcanzando una prevalencia del 0,3%, muy similar al valor obtenido en el HLC.

Sin embargo, todos los valores de prevalencias antes mencionados, incluyendo los obtenidos en la presente tesis, están muy por debajo de los alcanzados en un estudio realizado en EE.UU entre los años 2006 a 2009, en el cual se recolectaron un total de 101.530 muestras de heces de aves silvestres, con prevalencias calculadas de 4,0%, 6,7% y 4,7 para los años 2006, 2007 y 2008 respectivamente (Deliberto *et al.*, 2009).

De igual forma, al comparar nuestros resultados con los obtenidos en los pocos estudios publicados que existen sobre VIA en aves silvestres en Sudamérica, se evidencia una alta similitud de los valores, específicamente con los obtenidos en el HLC, como en un estudio realizado en Argentina entre los años 2006 a 2007, el cual recolectó 2.895 muestras provenientes de aves silvestres acuáticas de diferentes lugares de dicho país, en donde se detectaron 12 muestras positivas por el método de rRT-PCR, es decir, con una prevalencia de 0,4% (Pereda, 2008). Así mismo, en Perú, un estudio realizado entre los mismos años (2006 y 2007) en donde se colectaron un total de 2.405 muestras ambientales (heces) de aves silvestres en la costa central de este país, arrojó un total de nueve muestras positivas, es decir un prevalencia del 0,3% (Gherssi *et al.*, 2009). Otro estudio realizado en el mismo país, en Puerto Viejo (Lima) entre los años 2008 y 2009,

obtuvo 7 muestras positivas de un total de 900 recolectadas mediante el mismo método utilizado en este estudio, con una prevalencia calculada del 0,7% (Segovia *et al.*, 2013) Simultáneamente, al considerar estos valores, podemos comprobar que la prevalencia obtenida en la RNLP (1,04%) está muy por sobre el valor promedio obtenido en los otros estudios realizados en aves silvestres en Sudamérica, lo cual podría indicar una alta presencia de VIA en este sitio.

Con respecto a la estacionalidad de los valores de prevalencias obtenidos en este estudio, casi la totalidad de los meses en los que se detectaron muestras positivas a rRT-PCR, correspondientes a enero y marzo en el caso del HLC y diciembre, febrero, marzo y abril para la RNLP, indicarían una mayor presencia del virus de influenza A durante toda la época de verano y comienzos de la época de otoño.

Al relacionar estos resultados de positividad, con los obtenidos a través de los censos realizados de forma paralela en este estudio, se puede observar que no coinciden necesariamente y en su totalidad con los meses donde se registró una mayor riqueza y/o abundancia de especies de aves silvestres. Sin embargo, los dos meses que obtuvieron los valores más altos de prevalencia a virus de influenza, correspondientes a Diciembre (RNLP) y Enero (HLC), tuvieron a su vez, y en comparación a los otros meses, la presencia y abundancia más altas de individuos pertenecientes a especies migratorias inter-hemisféricas de origen boreal, específicamente de *Numenius phaeopus hudsonicus* (Zarapito) y *Leucophaeus pipixcan* (Gaviota de Franklin), las cuales migran durante el invierno (boreal) al territorio nacional, provienen desde países de Norteamérica donde actualmente existen casos confirmados de VIA en aves silvestres (OIE, 2017).

Esto coincide con los resultados obtenidos por Segovia *et al* (2013), en donde las muestras positivas se obtuvieron en los meses de verano, coincidiendo con el periodo donde se produce una alta concentración de aves silvestres migratorias en la zona. Los datos obtenidos se pueden relacionar con los hallazgos realizados por Hinshaw *et al.*, (1982), quienes señalan que la prevalencia del virus es baja durante el invierno boreal y en áreas de invernada de las aves (Webster *et al.*, 1992). Asimismo Hanson *et al.*, (2005), no encontraron una asociación entre la prevalencia de infección y la estación del año en Norteamérica.

Otro aspecto importante a destacar, es que todos los meses que obtuvieron muestras positivas a virus de influenza en ambos sitios, presentaron a su vez, índices

bajos de diversidad de especies. Esto podría indicar que la diversidad de especies de una comunidad, en este caso de aves silvestres, parece ser un factor que puede alterar la dinámica huésped-patógeno. En este contexto, el término “efecto dilución” fue acuñado por Osteld *et al.*, (2000) donde proponen que una alta diversidad de hospederos diluye la probabilidad de encuentro entre el patógeno y el hospedero susceptible, y por el contrario, el riesgo de enfermedad aumenta en las comunidades pobres en especies (LoGiudice, 2003).

Esta teoría explicaría los resultados obtenidos en este estudio, en donde el HLC, sitio que presentó una mayor diversidad de especies durante todos los meses de muestreo, obtuvo un valor de prevalencia (0,4%) muy inferior al obtenido por la RNLP (1,04%), el cual presentó bajos índices de diversidad de promedio.

Otro componente importante en el estudio de VIA en aves silvestres, es la posibilidad de transmisión de estos a las aves de corral, pudiéndoles causar una enfermedad leve, que sin embargo, después de unos tiempos algunos de estos virus pueden mutar y volverse altamente patógenos causando epidemias graves.

En Chile, los Sistemas Productivos de Traspatio (SPT) representan más de 150 mil pequeños productores, con más de 3,7 millones de aves domésticas criadas en estas unidades productivas (Hamilton-West, 2010; Hamilton-West *et al.*, 2012). En el caso de SPT de las aves domésticas, la crianza en conjunto de patos y gansos junto con otras aves, podría facilitar la introducción de VI, debido a que existe una tendencia de que patos domésticos atraigan a patos silvestres (Koch y Elbers, 2006).

Así mismo, la deficiencia de medidas de bioseguridad y las opciones de intercambio de animales y sus productos representan condiciones que hacen a los SPT más susceptibles de recibir y diseminar enfermedades infecciosas, lo que implica un riesgo potencial para la emergencia y re-emergencia de enfermedades animales que pueden ser transmitidas a los seres humanos, entre ellas la influenza A (FAO, 2007; Hamilton-West *et al.*, 2012). Esta situación queda en evidencia en los resultados obtenidos por Bravo-Vasquez *et al.*, (2016), en un estudio realizado en los SPT cercanos a la Reserva Nacional El Yali, en donde casi la totalidad de los SPT muestreados no tenían condiciones de bioseguridad y el contacto de aves domésticas, aves silvestres y seres humanos era altamente probable. Este mismo estudio, identificó la presencia de un virus influenza A H1N2 en cerdos, siendo este el primer reporte del virus de influenza

porcina en cerdos en SPT en Chile. Adicionalmente, en el mis SPT del que se identificó este asilado, también se encontraron muestras positivas de aves, lo que representa un riesgo para la reorganización de los segmentos genómicos de diferentes virus, representando así riesgo tanto para el ser humano como para la población animal (Alexander, 2007b). Considerando además que el mecanismo más importante para la diseminación de VIA entre granjas es la transferencia mecánica de heces infectantes (Suarez *et al.*, 2004; Alexander y Brown, 2009).

El ejemplo más cercano de esto, corresponde a la vez que Chile se vio afectado por subtipos de IAAP en el año 2002, siendo el único país en Sudamérica, con la presentación de dos brotes del subtipo H7N3 en la Región de Valparaíso, y donde la hipótesis más factible del posible ingreso del virus al plantel, fue a través de aves silvestres migratorias que se encontraron dentro del recinto al momento del brote (Rojas y Moreira, 2009).

De igual manera, en el primer brote de IA (H7) que ocurrió en enero del presente año y el cual tuvo lugar en un plantel de pavos de la empresa Sopraval ubicado en la Región de Valparaíso, específicamente en la comuna de Quilpué, se estudia la posibilidad de ingreso a través de aves migratorias, ya que tres semanas antes de la presentación del evento, se encontró la presencia de una gaviota muerta en las cercanías del plantel (SAG).

7.3 Asociación entre estacionalidad y prevalencia

Una de las características más notables de las comunidades de aves, en especial las de latitudes templadas, es su estacionalidad. De hecho, pocas especies pueden considerarse estrictamente sedentarias, puesto que muchas, sin realizar largos desplazamientos, cambian de lugar de residencia en algunas épocas del año, desplazándose latitudinalmente en las montañas o cambiando de tipo de hábitat. (Herrera, 1981).

En el presente estudio, fueron considerados como factores determinantes en la medición de la estacionalidad de los ensambles observados en ambos sitios, las variaciones en la diversidad y abundancia de especies de aves silvestres a lo largo del periodo de muestreo, en relación a la estación del año y con ello, determinar la posible asociación existente entre estos valores con la positividad a virus de Inf A de las muestras

ambientales recolectadas y posteriormente analizadas mediante rRT-PCR, realizando un análisis de regresión logística simple de manera independiente en ambos sitios.

En el Humedal Laguna Cartagena, la abundancia de individuos fue la única variable que presentó un efecto y/o asociación estadística con la positividad (OR 9,71 y $p = 0,0424$), considerando como un factor de riesgo aquellos meses en donde se presenta una baja abundancia de individuos.

Por su parte, en la Reserva Nacional Lago Peñuelas, la estación del año fue la única variable que presentó un efecto y/o asociación estadística (OR 5,47 y $p = 0,0288$), siendo la época de primavera-verano un factor de riesgo para la presencia del virus de influenza.

Los resultados arrojados por el análisis de regresión logística se asemejan y respaldan en parte a los resultados de asociación de carácter descriptivo realizado previamente en el segundo objetivo, ya que para el caso del HLC, y en consideración a un riesgo mayor en los meses de baja abundancia, el mes que obtuvo el valor más alto de prevalencia a VIA fue enero, el cuál presentó simultáneamente la segunda abundancia más baja de individuos (475) en comparación a los otros meses, sin embargo y a su vez, este mes obtuvo la presencia más alta de individuos pertenecientes a especies migratorias de origen boreal, pudiendo representar así un factor de riesgo para la presentación de VIA. De igual manera y para el caso de la RNLP, la estación del año correspondiente a primavera-verano, si parece estar asociada a la presencia de virus de influenza, ya que casi la totalidad de los meses en los que se detectaron muestras positivas a rRT-PCR, corresponden a esta época del año, resultados que como se mencionó anteriormente, coinciden con los obtenidos por Segovia *et al* (2013), en donde las muestras positivas se obtuvieron en los meses de verano, coincidiendo con el periodo donde se produce una alta concentración de aves silvestres migratorias en la zona de Puerto Viejo en Perú.

Las aves acuáticas que viajan por la ruta migratoria del Atlántico, llegan a Estados Unidos desde finales de Julio a Octubre presentando un *peak* de prevalencia de virus IA detectado en Agosto (Madsen *et al.*, 2013). Si se homologa este escenario al hemisferio Sur, donde las aves migratorias comienzan a llegar en Octubre, los resultados del presente estudio concuerdan con lo mencionado, al presentarse una mayor positividad

entre los meses de septiembre y marzo, meses que coinciden con el momento de mayor presencia de aves migratorias en el país.

Por otra parte, y según los resultados obtenidos en este estudio, la diversidad de especies de aves silvestres detectada en ambos sitios, no parece estar relacionada con la presencia de virus de Influenza.

Si bien este análisis estadístico arrojó dos factores de riesgos para la presentación de virus de Influenza, correspondientes a abundancia de individuos (HLC) y la estación del año (RNLP), estos resultados no son concluyentes en su totalidad, ya que en este estudio no fueron analizados los doce meses de manera correlativa correspondientes a un año en ambos sitios, lo que hace imposible afirmar de manera efectiva que ambas variables representan un el riesgo real para la presentación de virus de influenza A en poblaciones silvestres. Se necesitaría un estudio más amplio, con una mayor cantidad de datos para determinar una relación del riesgo más certera.

VIII. – CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio demuestran la presencia de virus influenza A en poblaciones de aves silvestres que habitan en los ecosistemas de los sectores Humedal Laguna Cartagena y la Reserva Nacional Lago Peñuelas, mediante la detección del virus en muestras ambientales recolectadas en ambos sitios. Sin embargo, se necesita la realización de más estudios para poder identificar cuáles son las variantes que circulan en estas poblaciones, para poder determinar así el real peligro tanto para la salud pública, como para la salud animal.

De igual manera, este estudio logró identificar un patrón estacional asociado a la detección del virus, determinando que la época de primavera-verano presenta los valores más altos de positividad, lo cual coincide con la llegada y presencia de aves silvestres migratorias de origen boreal en el territorio nacional, apoyando así la hipótesis de que estas especies actuarían como vectores para la introducción y propagación de estos virus a lo largo de sus rutas migratorias, lo que se debe validar con análisis filogenéticos de los virus identificados en Chile.

IX. - BIBLIOGRAFÍA CITADA

ALEXANDER DJ. 2007a. An Overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine* 25: 5637-5644.

ALEXANDER DJ. 2007b. Gripe Aviar. Enfermedad y diagnóstico. Sección de Virología, Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CIET), Fac. de Microbiología, Univ. de Costa Rica. Laboratorios de Referencia para la C.E., OIE, y FAO para la Gripe Aviar. Veterinary Laboratories. [Internet], [21/12/2009]. Disponible en: http://www.oie.int/ESP/normes/mmanual/pdf/es/2.1.14_Gripe_aviar_2007.pdf

ALEXANDER, D.J., BROWN, I.H. 2009. History of highly pathogenic avian influenza. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 28, 19-38.

BELDOMÍNICO P.M., M. UHART, H. FERREYRA, M. ROMANO Y G. MARTELEUR. 2008. Relevancia de las arroceras en la ecología de la influenza aviar [en línea]. En de la Balze, V.M. y D.E. Blanco (eds.): Primer taller para la Conservación de Aves Playeras Migratorias en Arroceras del Cono Sur. Wetlands International, Buenos Aires, Argentina.

BOSCH F, ORLICH M, KLENK D, R ROTT. 1979. The structure of the hemagglutinin, a determinant for the pathogenicity of influenza viruses. *Virology* .95: 197-207.

BOYCE, W.M., SANDROCK, C., KREUDER-JOHNSON, C., KELLY, T., CARDONA, C. 2009. Avian influenza viruses in wild birds: A moving target. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 32, 275-286.

BRAVO-VASQUEZ, DI PILLO, LAZO, JIMÉNEZ-BLUHM, SCHULTZ-CHERRY, S. AND HAMILTON-WEST. 2016. Presence of influenza viruses in backyard poultry and swine in El Yali wetland, Chile. *Epidemiology Unit. Preventive Veterinary Medicine Department. Faculty of Veterinary Sciences, University of Chile. Av. Santa Rosa 11735. Santiago, Chile.*

BROTONS, L., P. PONS & S. HERRANDO. 2005. Colonization of dynamic Mediterranean landscapes: where do birds come from after fire? *Journal of Biogeography* 32: 789-798.

BROWN JD, SWAYNE DE, COOPER RJ, BURNS RE, STALLKNECHT DE. 2007. Persistence of H5 and H7 avian influenza viruses in water. *Avian Dis.* 51: 285-289.

BUSCAGLIA C. 2004. Influenza Aviar. Artículo de Revisión. *Fac. Ciencias Veterinarias. Univ. Nac. De la Plata. Bs As. Argentina. In Vet* 2004. 6(1): 71-84.

BIBBY, C., BURGESS, N. & HILL, D. 1993. *Birds census techniques.* Academic press limited.

CAPUA I Y ALEXANDER DJ. 2009. Avian influenza infection in birds: a challenge and opportunity for the poultry veterinarian. *Poultry Science* 88:842-846.

CAPUA I, MARANGON S. 2006. Control of Avian Influenza in Poultry. *Emerg Infect Dis* 12(9).

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

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION [CDC]. Avian flu [Website online]. CDC. Available at: <http://www.cdc.gov/flu/avian/index.htm>. Accessed 1 Aug 2007.

DE LA MAZA M. & C. BONACIC (EDS.). 2013. Manual para el monitoreo de fauna silvestre en Chile. Serie Fauna Australis, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile, 202pp.

DELIBERTO J, SWAFFORD R, DALE L. NOLTE, PEDERSEN K, LUTMAN W, SCHMIT B, BAROCH J, KOHLER D AND FRANKLIN A. 2009. Surveillance for highly pathogenic avian influenza in wild birds in the USA. United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, Wildlife Services, National Wildlife Diseases Program, Fort Collins, USA and United States Department of Agriculture, Animal and Plant Health Inspection Service, Wildlife Services, National Wildlife Research Center, Fort Collins, Colorado, USA. 2009; 4: 426-439.

DENNIS JA. 2007. A review of avian influenza in different bird species. *Vet Microbiol.* 74:3-13.

DINGLE, H. 1980. Ecology and Evolution of migration. In: *Animal Migration Orientation, And Navigation.* S.A. Gauthereaux (Ed.) Academic Press, New York. Pp: 1-101.

DIRECCIÓN NACIONAL DE SANIDAD ANIMAL ARGENTINA. 2003. Manual de procedimientos Influenza aviar altamente patógena. Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Dirección de Luchas sanitarias. Programa de animales de Granja. Influenza aviar altamente patógena. Argentina. [Internet], [21/12/2009].

DOHOO L., MARTIN W., STRYHN H. 2003. *Veterinary Epidemiologic Research.* AVC Inc. Charlottetown Prince Edward Island Canada. 727.

ESPINAL C. 2007. Influenza aviar y amenaza de una pandemia. *Rev. CES. Med.* 21(Supl. 1): 49-54.

ESPIÑOZA C. Y BORGNA P. Actividades de vigilancias para la Influenza Aviar en la República de Argentina (1998-2009). Disponible en: <https://viejaweb.senasa.gov.ar/Archivos/File/File3746-cap-6a8.pdf>

FRANKLIN AB, VANDALEN KK, SHRINER SA ET AL. 2009. The role of environmental sampling in the surveillance of avian influenza virus in wild Birds. (Abstract) The 7th International Avian Influenza Conference: avian influenza in poultry and wild birds; 5–8 April, 2009, Athens, Georgia.

FOOD ALIMENTARY ORGANIZATION. (FAO). 2007. Influenza Aviar. Boletín de Enfermedades transfronterizas de los animales. Emergency Prevention System Empres. FAO División de Producción y Sanidad Animal. Jul 2004 - Dic. 2006. [Internet], [04/12/2007]. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1229s/a1229s00.pdf>

FOOD ALIMENTARY ORGANIZATION, (FAO). 2016. Global animal disease information system (Empres-i). En línea]. Disponible en: <http://empres-i.fao.org/eipws3g/>.

GARCÍA-GARCÍA J, RAMOS C. 2006. La influenza, un problema vigente de salud pública. *Salud Publica Mex*; 48: 244-267.

GARCÍA S, MARTÍNEZ C, MOLINA S, SANCES D. Y M. TAPIA. 2006. Rol de las aves migratorias en la transmisión de la Influenza Aviar. Univ. de Chile. Fac. de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Departamento de Medicina Preventiva Animal Epidemiología. [Internet], [21/12/2010]. Disponible en: https://www.ucursos.cl/veterinaria/2009/1/DU12/1/material_alumnos/previsualizar?id_material=100

GHERSI BM, BLAZES DL, ICOCHEA EA, GONZÁLEZ RV, KOCHER T, TINOCO YF, SOVERO. MM, LINDSTRON S, SHU B, KLIMOV A, GONZALES A, MONGTGOMERY JM. 2009. Avian Influenza in Wild Birds, Central Coast of Peru. *Emerging Infect Dis* 15(6): 935-938.

GRIGERA, D. & C. PAVIC. 2007. Ensamblajes de aves en un sitio quemado y en un sitio no alterado en un área forestal del noroeste de la Patagonia argentina. *Hornero* 22: 29-37.

GONZÁLEZ A.L., VUKASOVIC M.A., ESTADES C.F. 2011. Variación temporal en la abundancia y diversidad de aves en el humedal del Río Itata, región del Bío-Bío, Chile. *Centro de Estudios Avanzados en Ecología y Biodiversidad & Departamento de Ecología, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago. Chile*75(2): 170-181, 2011.

GHERSI BM, BLAZES D, ICOCHEA E, GONZÁLEZ R, KOCHER T, TINOCO Y, SOVERO M, ET AL. 2009. Avian influenza in wild birds, central coast of Peru. *Emerg Infect Dis* 15: 935-938.

GHERSI, B.; SOVERO, M.; ICOCHEA, E.; GONZALEZ, R.; BLAZES, D.; GONZALEZ, A.; MONTGOMERY, J. 2011. Isolation of Low-pathogenic H7N3 Avian Influenza from Wild Birds in Perú. *J. Wildl. Dis.* 47 (3): 792-795.

HAMILTON-WEST, C., 2010. Determinación de diferencias en riesgo de recepción y diseminación de influenza aviar altamente patógena en zonas prioritarias para el ingreso de esta enfermedad a Chile. Departamento de Medicina Preventiva. Universidad de Chile, Santiago, Chile, 98.

HAMILTON-WEST, C., ROJAS, H., PINTO, J., OROZCO, J., HERVÉ-CLAUDE, L.P., URCELAY, S., 2012. Characterization of backyard poultry production systems and disease risk in the central zone of Chile. *Research in Veterinary Science* 93, 121-124.

HANSON BA, SWAYNE DE, SENNE DA, LOBPRIES DS, HURST J, STALLKNECHT DE. 2005. Avian Influenza Viruses and Paramyxoviruses in Wintering and Resident Ducks in Texas. *J Wildl Dis* 41(3): 624-628.

HERRERA, C.M. 1981. Organización temporal de las comunidades de aves. *Doñana Acta Vertebrata*, 8: 79-101.

HINSHAW VS, WEBSTER RG, RODRÍGUEZ RJ. 1981. Influenza A viruses: combinations of hemagglutinin and neuraminidase subtypes isolated from animals and other sources. *Arch Virol* 67: 191-201.

HAUSE, B.M., COLLIN, E.A., LIU, R., HUANG, B., SHENG, Z., LU, W., WANG, D., NELSON, E.A., LI, F. 2014. Characterization of a Novel Influenza Virus in Cattle and Swine: Proposal for a New Genus in the Orthomyxoviridae Family. *mBio* 5. INE, 2007. Censo Agropecuario y Forestal. Santiago, Chile.

HERRERO - URIBE L. 2008. El virus influenza y la gripe aviar. *Acta Médica Costarricense. Acta Méd Costarricense* 50(1): 13-19.

JARAMILLO A. 2005. Libro Aves de Chile. Editorial LYNX.

KRAUSS, S., D. WALKER, S. PRYOR, L. NILES, C. LI, V. HINSHAW Y R. WEBSTER. 2004. Influenza Aviruses of migrating wild aquatic birds in North America. *VectorBorne Zoonot.Dis*, 4, 177-189.

KOCH, G., ELBERS, A.R.W., 2006. Outdoor ranging of poultry: a major risk factor for the introduction and development of High-Pathogenicity Avian Influenza. *NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences* 54, 179-194.

ERIK A KARLSSON, KARL CIUDERIS, PAMELA J FREIDEN, BRADLEY SEUFZER, JEREMY C JONES, JORDAN JOHNSON, ROCIO PARRA, AGUSTIN GONGORA, DARIO CARDENAS, DIANA BARAJAS, JORGE E OSORIO, STACEY SCHULTZ-CHERRY. 2013. Prevalence and characterization of influenza viruses in diverse species in Los Llanos, Colombia.

LAKE, P. S. 2011. Drought and Aquatic Ecosystems: Effects and Responses. John Wiley & Sons.

LANTSCHNER, M. & V. RUSCH. 2007. Impacto de diferentes disturbios antrópicos sobre las comunidades de aves de bosques y matorrales de *Nothofagus* antártica en el NO Patagónico. *Ecología Austral* 17: 99-112.

LOGIUDICE. 2003. The ecology of infectious disease: effects of host diversity and community composition on Lyme disease risk. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:567-71.

MA, Z., LI, BO., ZHAO, B., JING, K., TANG, S. & CHEN, J. 2004. Are artificial wetlands good alternatives to natural wetlands for waterbirds – A case study on Chongming Island, China. *Biodiversity and Conservation*. 13: 333-350.

MADSEN J. M., ZIMMERMANN N. G., TIMMONS J., TABLANTE N. L. 2013. Avian Influenza Seroprevalence and Biosecurity Risk Factors in Maryland Backyard Poultry: A Cross-Sectional Study. *PLoS ONE* 8(2): e56851, DOI: 10.1371

MACLACHLAN, N., DUBOVI, E.J., 2011. Chapter 21 - Orthomyxoviridae. In: Maclachlan, N.J., Edward, J.D. (Eds.), *Fenner's Veterinary Virology (Fourth Edition)*. Academic Press, San Diego, 353-370.

MARTÍNEZ, D. & D. GONZÁLEZ. 2004. Las Aves de Chile, Nueva Guía de Campo. Ediciones del Naturalista, Santiago.

MARTIN V, FORMAN A, LUBROTH J. 2007. Preparándose para la Influenza aviar altamente patógena. Dir. de Producción y Sanidad Animal. Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. FAO. Roma Italia. 2007.

MORENO AA. 2000. Cols. Principales medidas en epidemiología. Salud Pública Mexico. 2000; 42 (4): 337-348.

MUNSTER, VJ., BAAS, C., LEXMOND, P., WALDENSTROM, J., WALLENSTEN, A.; FRANSSON, T.; RIMMELZWAAN, G.F.; BEYER, W.E; SCHUTTEN, M.; OLSEN, B.; OSTERHAUS, A.D Y FOUCHIER, R.A. 2007. Spatial, temporal, and species variation in prevalence of influenza A viruses in wild migratory birds. PLoS.Pathog. 3: e61.

NAYAK, D., SHIVAKOTI, S., BALOGUN, R.A., LEE, G., ZHOU, Z.H., 2013. Structure, disassembly, assembly, and budding of influenza viruses. Textbook of Influenza, 2nd Edition, 35-56.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE METEOROLOGÍA. (WMO). 2016. Disponible en: https://www.wmo.int/pages/index_es.html

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). 2013. Real-time RT-PCR Protocol for the Detection of Avian Influenza A (H7N9) Virus. [Protocolo oficial] 5p.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). 2014. Infección humana por virus de la gripe aviar A(H5N1) virus – Actualización. [En línea]. Disponible en: http://www.who.int/csr/don/2014_01_09_h5n1/es/.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL (OIE). 2008. Código Sanitario para los animales terrestres. Influenza Aviar. [Internet], [28/04/2008]. Disponible en: http://www.oie.int/esp/normes/MCode/es_chapitre_1.10.4.htm

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL (OIE). 2009. Terrestrial Manual. Avian Influenza. Version adopted by the World Assembly of Delegates of the OIE in May 2009. [Internet], [15/08/2009]. Disponible en: http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.03.04_AI.pdf

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL (OIE). 2015. Update on highly pathogenic avian influenza in animals (type H5 and H7). Follow-up report No.7. United States [Internet]. París: OIE; 2015 Apr [cited 2015 May 26]. Available from: http://www.oie.int/wahis_2/public%5C..%5Ctemp%5Creports/en_fup_0000017530_20150416_144938.pdf

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL (OIE). 2016a. Update on highly pathogenic avian influenza in animals (type H5 and H7). 2016a. [Internet]. OIE; Último informe recibido el 19 de julio de 2016. Available from: <http://www.oie.int/es/sanidad-animal-en-el-mundo/actualizacion-sobre-la-influenza-aviar/2016/>

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL (OIE). 2016b. Código sanitario para los animales terrestres. (En línea). Diponible en: <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/codigo-terrestre/>.

OLSEN B, MUNSTER V, WALLENSTEN A, WALDENSTRÖM J, OSTERHAUS A, FOUCHIER R. 2006. Global patterns of Influenza A virus in wild birds. *Science* 312:384-388.

OSTFELD R. KEESING F. 2000. Biodiversity and Disease Risk: the Case of Lyme Disease. Institute of Ecosystem Studies. *Conservation Biology*. 772-728. Volumen 14, No. 3, June 2000.

PAGANO M. 2012. Logistic Regression. *Health in Numbers: Quantitative Methods in Clinical & Public Health Research*, Harvard.

PALESE, P., AND M.L. SHAW. 2007. Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication, In: D.M. Knipe and P.M. Howley (eds), *Fields Virology* 5th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 1647–1689.

PEREDA AJ, UHART M, PEREZ AA, ZACCAGNINI ME, LA SALA L, DECARRE J, GOIJMAN A, SOLARI L, SUAREZ R, CRAIG MI, VAGNOZZI A, RIMONDI A, KONIG G, TERRERA MV, KALOGHLIAN A, SONG H, SORRELL EM, PEREZ DR. 2008. Avian influenza virus isolated in wild waterfowl in Argentina: evidence of a potentially unique phylogenetic lineage in South America. *Virology* - en prensa. [Internet], [12/01/2009]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18632129>

PÉREZ, ALBERTO A., ZACCAGNINI, M. ELENA, & PEREDA, ARIEL J. 2011. La Influenza Aviar y sus implicancias para la salud de las aves silvestres de América del Sur. *El hornero*, 26(1), 29-44. Recuperado en 15 de febrero de 2017, de http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S007334072011000100003&lng=es&tlng=es.

PITA FERNÁNDEZ S. 1996. Determinación del tamaño muestral. Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complejo Hospitalario Juan Canalejo. A Coruña. *Cad Aten Primaria* 1996; 3: 138-14. Actualización 06/03/2001.

ROJAS H y MOREIRA R. 2002. Influenza Aviar en Chile: Una Sinopsis. Ministerio de Agricultura. División de Protección Pecuaria. Salud Animal e Inocuidad de los Alimentos. Gobierno de Chile. [Internet], [30/11/2006]. Disponible en: http://www2.sag.gob.cl/Pecuaria/bvo/BVO_6_numero_especial_oct_2006/articulos/sinopsis_IA_2002.pdf.

SERVICIO AGRICOLA Y GRANADERO. 2012. Censos nacionales de aves acuáticas. Informe N° 3 FINAL. Resumen de información de censos Monitoreo 2011 – 2012.

SHANNON, C.E. and W. WEAVER. 1949. *The Mathematical Theory of Communication*. University Illinois Press, Urbana, IL.

SERVICIO NACIONAL DE SANIDAD Y CALIDAD AGROALIMENTARIA [SENASA]. 2009. Manual de Procedimientos Influenza Aviar. Argentina: SENASA. p 9-13.

SEGOVIA K. 2013. Presencia del virus de influenza aviar en las aves silvestres de los humedales de Puerto Viejo. Tesis de Médico Veterinario. Lima: Univ. Nac. Mayor de San Marcos. Perú.

SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO (SAG). 2015. Informe Sanidad Animal Chile. Servicio Agrícola y Ganadero División de Protección Pecuaria Subdepartamento de Sanidad Animal. Disponible en:
http://www.sag.gob.cl/sites/default/files/situacion_sanitaria_animal_2014.pdf

SPACKMAN E., SENNE D., MYRES T., BULAGA., GARBER L., PERDUE M., LOHMAN K., DAUM L., SUAREZ D. 2002, Development of a Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A Influenza Virus and the Avian H5 and H7 Hemagglutinin Subtypes, *Journal of clinical microbiology*, p. 3256 – 3260.

SPACKMAN E, PANTIN-JACKWOOD M, SWAYNE D, SUAREZ D. 2009. An Evaluation of Avian Influenza Diagnostic Methods with Domestic Duck Specimens. *Avian Diseases* 53:276–280.

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

STALLKNECHT DE, BROWN JD. 2008. Ecology of avian influenza in wild birds. In: Swayne DE, ed. *Avian Influenza*. Blackwell Publishing, Ames, pp. 43–56.

STALLKNECHT DE AND BROWN JD. 2009. Tenacity of avian influenza viruses. *Rev Sci Tech.* 2009;28(1):59-67.

STRAUSS J, STRAUSS E. 2008. *Viruses and human disease*. Second edition. San Diego, CA: Elsevier. p 162-174.

SORIANO L. 2009. Monitores de Influenza Aviar en aves silvestres en humedales de la República Mexicana. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas.

SUAREZ, D.L., SENNE, D.A., BANKS, J., BROWN, I.H., ESSEN, S., LEE, C.-W., MANVELL, R., MATHIEW- BENSON, C., MORENO, V., PEDERSEN, J., PANIGRAHY, B., ROJAS, H., E., S., ALEXANDER, D.J., 2004. Recombination resulting in virulence shift in avian influenza outbreak, Chile. *Emerg Infect Dis.* 10, 693-699.

SUAREZ G. 2006. Historia natural de la influenza aviar o gripe del pollo: análisis sanitario actual y prospectivo. En: Grisolia S, eds. *La gripe aviaria: un reto de salud pública*. España: Ed. de la Univ.de Castilla-La Mancha. p 23.

SWAYNE DE, HALVORSON DA. 2008. Influenza. En: Calnek BW. *Diseases of Poultry*. 11a ed. Iowa State Press, USA. p135- 160.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA) 2007. Plan Estratégico entre agencias de EEUU. Un sistema de detección temprana del virus H5N1 de la Influenza aviar altamente patógena en aves migratorias silvestres. [Internet], [15/01/2007]. Disponible en:
http://www.usda.gov/wps/portal/en_espanol?contentidonly=true&contentid=en_espanol/sp0095.06.html.

VILINA Y. COFRÉ H. 2006. Libro “Biodiversidad de Chile: Patrimonios y Desafíos”; Capítulo 2. CONAMA, primera edición, 2006.

VILLASEÑOR JF. 1994. Aspectos Fisiológicos de la Migración en Aves: Fuente de Energía, Ajustes Musculares, Respiración y Control Hormonal.

WRIGHT P, WEBSTER R. 2001. Orthomyxoviruses. En: Knipe D, Howley P, eds Fields Virology, vol. 1. 4a. ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, p 1487-1531.

WEBSTER RG, YAHHNO M, HINSAW VS, BEAN WR JR, MURTI KG. 1978. Intestinal influenza: replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology* 84, 268–78.

WEBSTER RG, BEAN WG, GORMAN OT, CHAMBERS TM, KAWAOKA Y. 1992. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological Reviews* 56, 152–79.

WEBSTER R, KRAUSS S, HULSE-POST D, STUM - RAMIREZ K. 2007. Evolución del virus de la Influenza en Aves Silvestres. Division of Virology Department of Infectious Diseases, St. Jude Children/ Research Hospital, 332 North Lauderdale Memphis, Tennessee 38105, USA. [Internet], [05/06/2007]. Disponible en: http://www.who.int/csr/disease/avian_influenza/country/cases_table_2007_01_15/en/index.html

XIAN, Q., YAN-HUA, Q., CHANG-JUN, B., XI-LING, G., LUN-BIAO, C., FEN-YANG, T., HONG, J., YONG, H., PEI-QUAN, C., BING, L., KE, X., CHAO, S., FENG-CAI, Z., MING-HAO, Z., HUA, W., 2013. Probable person to person transmission of novel avian influenza A (H7N9) virus in Eastern China, 2013: epidemiological investigation. *BMJ* 347.