



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

**DETERMINACIÓN DE INFECCIÓN CONTRA *Avian avulavirus 19* EN
PINGÜINOS DEL TERRITORIO ANTÁRTICO CHILENO
DURANTE EL AÑO 2017**

Florencia Ignacia Olivares Becerra

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

PROFESOR GUÍA VÍCTOR MANUEL NEIRA RAMÍREZ
Universidad de Chile

Financiamiento Proyecto INACH 46-16, Laboratorio de Virología Animal

SANTIAGO, CHILE
2018



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

**DETERMINACIÓN DE INFECCIÓN CONTRA *Avian avulavirus 19* EN
PINGÜINOS DEL TERRITORIO ANTÁRTICO CHILENO
DURANTE EL AÑO 2017**

Florencia Ignacia Olivares Becerra

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

Nota Final:

| | | Nota | Firma |
|--------------------|-------------------------|-------|-------|
| Profesor Guía | Víctor Neira Ramírez | | |
| Profesor Corrector | Carlos Navarro Venegas | | |
| Profesor Corrector | Cristóbal Briceño Urzúa | | |

Financiamiento Proyecto INACH 46-16, Laboratorio de Virología Animal

SANTIAGO, CHILE
2018

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA

Quisiera agradecer al Dr. Víctor Neira, por darme la oportunidad de realizar esta investigación, y a todo el equipo del laboratorio de virología animal (Juan Mena, Digna Oñate, Rodrigo Tapia) por enseñarme, aconsejarme y por apoyarme cuando los procedimientos no salían como debían.

También quisiera agradecer infinitamente a mi madre, por su apoyo incondicional y por siempre empujarme a ser una mejor versión de mí misma. A mis hermanas, por ser ejemplos de mujeres profesionales que luchan dentro de sus áreas para hacer de éste, un mejor mundo.

A Emilio, por aconsejarme de tomar la decisión de embarcarme en este proyecto y por siempre motivarme a ir en busca de mi propia dirección.

ÍNDICE DE CAPÍTULOS

| | | | |
|----|--|-------|----|
| 1 | Resumen | | 1 |
| 2 | <i>Abstract</i> | | 2 |
| 3 | Introducción | | 3 |
| 4 | Revisión Bibliográfica | | 5 |
| | 4.1 Generalidades | | 5 |
| | 4.2 Transmisión | | 6 |
| | 4.3 Especies de pingüinos residentes en la Antártica | | 8 |
| 5 | Hipótesis | | 9 |
| 6 | Objetivo General | | 9 |
| 7 | Objetivos Específicos | | 9 |
| 8 | Material y Métodos | | 10 |
| | 8.1 Obtención y procesamiento de muestras | | 10 |
| | 8.2 Inactivación del suero | | 11 |
| | 8.3 Prueba de Hemaglutinación (HA) | | 11 |
| | 8.4 Técnica de Inhibición de la Hemaglutinación | | 12 |
| | 8.5 Análisis estadístico y presentación de resultados | | 13 |
| 9 | Resultados | | 14 |
| | 9.1 Análisis estadístico | | 17 |
| 10 | Discusión | | 19 |
| 11 | Conclusión | | 22 |
| 12 | Bibliografía | | 23 |
| 13 | Anexos | | 27 |
| | 13.1 Árbol filogenético bayesiano | | 27 |
| | 13.2 Resumen de las posibles formas de diseminación | | 28 |
| | 13.3 Otras especies presentes en los sitios de muestreo | | 28 |
| | 13.4 Países contratantes del Tratado Antártico | | 29 |
| | 13.5 Certificados de bioseguridad y bioética | | 30 |
| | 13.6 Protocolo de preparación de buffer Borato salino | | 37 |
| | 13.7 Protocolo propagación del virus | | 37 |

ÍNDICE DE CUADROS

| | | |
|-----------|--|----|
| Cuadro 1: | Locaciones y número de muestras obtenidas..... | 10 |
| Cuadro 2: | Sueros utilizados en HI y prevalencia mínima detectable..... | 12 |
| Cuadro 3: | Resumen de los valores de HA obtenidos por sitio..... | 17 |
| Cuadro 4: | Comparaciones múltiples realizadas con test de Dunn..... | 18 |
| Cuadro 5: | Chi cuadrado realizado con datos de Shirreff..... | 19 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 1: | Diagrama de paramixovirus..... | 6 |
| Figura 2: | Organización genética del virus de Newcastle y Avian avulavirus 19.... | 6 |
| Figura 3: | Mapa península Antártica | 10 |
| Figura 4: | Imagen resultados prueba hemaglutinación..... | 11 |
| Figura 5: | Gráfico de resultados generales por especie..... | 14 |
| Figura 6: | Resultados individuales por locación..... | 15 |
| Figura 7: | Resultados de acuerdo con el mapa de muestreo y proporción de animales positivos/total..... | 15 |
| Figura 8: | Resultados del cabo Shirref..... | 16 |
| Figura 9: | Ubicación de Kopaitic y resultados de forma resumida..... | 17 |

RESUMEN

El *Avian avulavirus 19* (APMV) es un paramixovirus descubierto y aislado en 2017 desde pingüinos de Papúa (*Pygoscelis papua*) en la Isla Kopaitic del Territorio Antártico Chileno. En esta investigación se realizó la técnica de inhibición de la hemaglutinación (HI) para medir la presencia de anticuerpos específicos para este virus en las tres especies de pingüinos *Pygoscelis spp.* Los sueros se obtuvieron desde 7 localidades; Cabo Shirreff, Isla Doumer, Punta Biscoe, Bahía Paraíso, Isla Lagotellerie, Isla Ardley e Isla Avian. De un total de 496 muestras procesadas solo 45 resultaron positivas (9%). Se obtuvo evidencia del virus en las tres especies estudiadas, para los pingüinos de Adelia (*P. adeliae*) 1/80 (1,25%); en el caso de los de barbijo (*P. antarctica*) 30/206 (14,6%); y por último los Papúa 14/210 (6,7%). En cuanto a los sitios estudiados, 4/7 resultaron positivos (Cabo Shirreff, Doumer, Punta Biscoe y Bahía Paraíso). Del total de sitios muestreados, se identificaron tres grupos con diferentes niveles de anticuerpos, lo cual fue estadísticamente significativo como alto, medio y negativo. En los sitios donde se obtuvo un número reducido de muestras, se realizó una estimación de la prevalencia: Punta Biscoe $\geq 20\%$; Isla Doumer $\geq 14,5\%$ y en Bahía Paraíso $\geq 17\%$. Por otro lado, en Cabo Shirreff, donde se obtuvo una mayor cantidad de muestras de barbijo, se obtuvo una prevalencia verdadera de 14,6%. En la Isla Ardley, Isla Lagotellerie e Isla Avian no se encontró evidencia de infección. En cuanto a los posibles medios de transmisión de este nuevo virus, se describe a las aves acuáticas migratorias como importantes diseminadores en el ambiente. De éstas, las más relevantes serían los salteadores (*Stercorarius spp.*), que depredan pingüinos y que están en contacto directo con éstos. En el caso del virus de Newcastle (NDV), las personas son su principal riesgo de transmisión. Mucho queda por descifrar en cuanto a su forma de transmisión. En conclusión, la hipótesis resultó ser verdadera debido a que se encontró evidencia de infección en las tres especies estudiadas. Esta investigación crea nuevas interrogantes, sería interesante descifrar la temperatura mínima a la que AVA 19 permanece infectivo, quizás las bajas temperaturas benefician a este virus envuelto. Este es el primer trabajo donde se investiga la seroprevalencia de *Avian avulavirus 19*, futuros trabajos son necesarios para entender mejor la dinámica infecciosa de estos nuevos agentes.

Palabras claves: *Avian Avulavirus 19*, APMV, Antártica, pingüinos *Pygoscelis*.

ABSTRACT

The *Avian avulavirus 19* (APMV) is a paramyxovirus discovered and isolated in 2017 from Gentoo penguins (*Pygoscelis papua*) sampled in Kopaitic island, Chilean Antarctic territory. Hemagglutination inhibition (HI) assay were performed in order to measure the presence of specific antibodies for this virus in three species of *Pygoscelis spp.* The sera were obtained from 7 locations; Cape Shirreff, Doumer Island, Biscoe Point, Paradise Bay, Lagotellerie Island, Ardley Island and Avian Island. A total of 496 samples were tested, 45 (9%) were positive. Evidence of the virus infection was found on all three species. In the case of Adelie penguins (*P. adeliae*) 1 out of 80 (1.25%) were positive; for the Chinstrap penguins (*P. antarctica*) 30 out of 206 (14.6%); and finally, for the Gentoo penguins 14 out of 210 (6.7%) were positive. Overall results indicated that 4 locations were positive (Cape Shirreff, Doumer Island, Biscoe Point and Paradise Bay). From these sites, three groups with different antibody concentrations (high, medium and no antibodies) were identified, this was statistically significant. In the places where a few amounts of sera were obtained, it could only be performed an estimation of the prevalence. In Biscoe Point it's $\geq 20\%$; $\geq 14.5\%$ for Doumer Island and $\geq 17\%$ in Paradise Bay. On the other hand, in Cape Shirreff, where a bigger amount of sera were sampled in Chinstrap penguins, a true prevalence of 14.6% were obtained. In the Ardley, Lagotellerie and Avian Islands no evidence of infection were found. As for the possible means of transmission of this new virus, it's described in the literature that migratory waterfowl are important environment propagators of paramyxoviruses. The most relevant ones are skuas (*Stercorarius spp.*), which predate on penguins and are in direct contact with them. In the case of NDV people are the mains transmission risk. A lot remains unknown as for this virus transmission. In conclusion, the hypothesis proved positive because serological evidence was found on all three species. This research brings new questions. It would be interesting to figure out the minimum temperature in which AVA 19 remains infective, it may be possible that low temperatures benefit this enveloped virus. This is the first work where the seroprevalence of Avian avulavirus 19 is researched. Future works are needed to understand the infectious dynamics of these new agents.

Key words: *Avian Avulavirus 19*, APMV, Antarctic, *Pygoscelis* penguins.

INTRODUCCIÓN

El virus más conocido de la familia *Paramyxoviridae* que afecta a aves, corresponde al virus de Newcastle (NDV), una cepa de *Avian avulavirus 1* (ICTV, 2016). Esto se debe a que afecta en gran magnitud a las aves de corral y su control requiere de grandes inversiones económicas en vacunas y un estricto control de la bioseguridad (Alexander, 2000). Existían 13 especies de avulavirus aviares reconocidas oficialmente hasta el año 2017 (*Avian avulavirus* del 1 al 13) (ICTV, 2016; Karamendin *et al.*, 2016; Hyun-Jeong *et al.*, 2017). Sin embargo, se identificaron 3 nuevas especies que se denominaron correlativamente *Avian avulavirus 14*, 15 y 16 (Kuhn *et al.*, 2017; ICTV, 2018). Muchos de estos paramixovirus aviares (APMV) se han encontrado en aves silvestres (Goraichuk *et al.*, 2017; Bui *et al.*, 2014). Solo *Avian avulavirus 1*, 2 y 3 han causado enfermedades significativas (acompañadas de impacto económico) en la industria avícola (ICTV, 2016).

Además, recientemente fueron descritas tres nuevas especies de paramixovirus en pingüinos de Papua (*Pygoscelis papua*) en la Isla Kopaitic, los que fueron denominados: Antarctic penguin virus A, B y C (este último será nombrado APC). Se realizaron ensayos serológicos y análisis genéticos que probaron que estos virus no tenían antigenicidad cruzada y que por ende serían especies distintas, que fueron designadas como *Avian avulavirus 17*, 18 y 19 respectivamente (Kuhn *et al.*, 2017; Neira *et al.*, 2017; ICTV, 2018). Frente a este descubrimiento es imperativo generar mayor información sobre el impacto que podrían tener estos virus en las distintas poblaciones de pingüinos.

La conservación de especies silvestres es un tema muy desafiante, debido a las complejas interacciones entre las distintas especies y el medio en el que se desarrollan. Por esta razón surge la medicina de la conservación, como una actividad interdisciplinaria que provee de un marco de estudio de las conexiones entre la salud del planeta y la salud de todas las especies. Estas interacciones son impredecibles, se encuentran en constante cambio y son difíciles de cuantificar (Aguirre *et al.*, 2002). El estudio de las enfermedades presentes en la fauna silvestre contribuye no solo a su conservación, sino también a la salud pública, debido a que algunas de estas enfermedades son zoonóticas. Es por esta razón que resalta la importancia del trabajo interdisciplinario. El incremento de los viajes y de la interconectividad global, permiten que la transmisión de enfermedades sobrepase las medidas preventivas de control

y el cambio de hábitat ha llevado a una exposición a enfermedades sin precedentes (Nara *et al.*, 2008).

Este trabajo se centra en evaluar evidencia serológica de la nueva especie *Avian avulavirus 19* en tres especies de pingüinos pertenecientes al género *Pygoscelis* presentes en islas antárticas, siempre intentando enfocarlo desde la perspectiva de la medicina de la conservación, para poder evaluar posibles fuentes de infección, diseminación del virus y también su capacidad de permanecer en el ambiente. Este enfoque nos permite abarcar el problema de forma integral, evaluando diferentes aristas.

También se relacionaron los resultados obtenidos mediante un mapa que permite orientar posibles relaciones entre las poblaciones infectadas. Los objetos del estudio son: pingüino Papúa (*P. papua*), pingüino de Adelia (*P. adeliae*) y pingüino de barbijo (*P. antarctica*).

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

GENERALIDADES

La especie *Avian avulavirus 19*, con su cepa prototipo virus C de pingüino Antártico (APC), pertenece al orden *Mononegavirales*, a la familia *Paramyxoviridae* y al género *Avulavirus*. Los paramixovirus corresponden a virus RNA de una hebra de sentido negativo, de un tamaño aproximado de 15.000 nucleótidos conformando un genoma organizado en 6 genes (Figura 1) (Zohari y Munir, 2013).

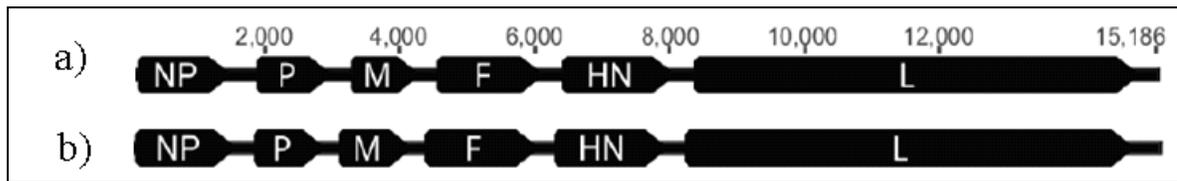


Figura 1

a) Organización genética del virus de referencia (NDV) y b) del *Avian avulavirus 19*.

Los paramixovirus son virus envueltos, es decir, poseen envoltura (bicapa lipídica) que obtienen de su célula blanco y realizan toda su replicación en el citoplasma (ICTV, 2016; Maclachlan *et al.*, 2017). Poseen dos glicoproteínas de su superficie: 1) proteína de fusión (F) que permite el ingreso a la célula y 2) hemaglutinina-neuroaminidasa (HN) que media la unión celular y permite que el virus hemaglutine glóbulos rojos, actividad esencial para el desarrollo de esta investigación. HN también facilita la salida de los nuevos viriones desde la célula blanco. Las otras glicoproteínas corresponden a 3) fosfoproteína (P), que es un cofactor de la RNA polimerasa viral que encapsula el RNA durante la replicación; 4) polimerasa grande (L) que corresponde a una subunidad esencial de la RNA polimerasa viral cuya función es catalizar la síntesis de RNA viral; 5) proteína de matriz (M), asociada a proteínas citoplasmáticas tanto de la bicapa lipídica como de la nucleocápside y es la principal organizadora del ensamblaje y de la gemación viral posterior; dentro del virus se encuentran 6) la nucleoproteína (N) cuya función es recubrir el material genético viral y otorgarle su forma helicoidal, lo que se cree brinda protección de una posible digestión por nucleasas, también minimiza el alineamiento de un RNA mensajero a su hebra complementaria y provee de sitios de unión para el ensamblaje de la nucleocápside de los

nuevos viriones. Estas seis proteínas conforman la estructura viral de los integrantes de la familia *Paramyxoviridae* (Figura 2) (Knipe y Howley, 2013; Maclachlan *et al.*, 2017).

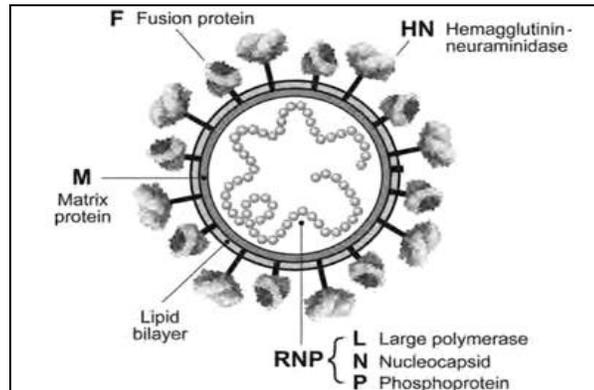


Figura 2: Diagrama de un paramixovirus donde se observan las proteínas enumeradas anteriormente. La hebra negativa de RNA se encuentra dentro del virus, rodeada de la nucleocápside (N), junto a ésta se encuentran las proteínas L y P (obtenido de Knipe y Howley, 2013 pp 959, adaptación).

Entre los paramixovirus reconocidos a la fecha se encuentran los *Avian avulavirus* del 1 al 16 (ICTV, 2016; Kuhn *et al.*, 2017; ICTV, 2018). Además, debemos agregar las cepas encontradas por Neira, *et al.*, en el 2017, cuyas cepas se denominaron Antarctic penguin virus A, B y C, los que posteriormente fueron designados de forma definitiva como *Avian avulavirus* 17, 18 y 19, respectivamente (Kuhn *et al.*, 2017; ICTV, 2018). En el **anexo 1** se puede observar un árbol filogenético bayesiano realizado por Neira *et al.*, (2017) en el que se demuestra que los virus encontrados son genéticamente diferentes a los ya descritos.

TRANSMISIÓN

Debido a que el *Avian avulavirus 19* es una especie recientemente descrita, poco se sabe al respecto de cuáles serían sus medios de transmisión y las especies a las que afectaría. Para esto, es importante determinar en qué lugares se desplazan las poblaciones de pingüinos en estudio y con quienes interaccionan, además de comprender los mecanismos de transmisión de las otras especies de avulavirus aviáres, que nos podrían dar indicios de las formas de transmisión de este virus. Esto último tiene una cierta complejidad asociada, debido a que incluso en el caso del virus de Newcastle (NDV), sin duda el más estudiado de los paramixovirus aviáres, existe un desconocimiento sobre su epidemiología y posibles

reservorios en lugares tan distantes como la Antártica. Por lo anterior, se requiere mayor conocimiento sobre las cepas que se encuentran en estas aves silvestres, debido a que podrían evolucionar en otras y ser diseminadas a otros territorios (Thomazelli *et al.*, 2010).

Pocos estudios se han realizado respecto de la presencia de paramixovirus en el orden Charadriiformes, sin embargo, se han logrado aislar avulavirus aviáres correspondientes a las especies 1, 4 y 6 (Hlinak *et al.*, 2006). Este orden es muy importante debido a que son aves que anidan en Sudamérica y que crían en el Ártico, por ende, altamente migratorias (Clark *et al.*, 1993; Coffee *et al.*, 2010). Las aves acuáticas migrantes están descritas como vectores de importancia para la diseminación en la naturaleza de los paramixovirus (Fornells *et al.*, 2012). Dentro de las familias de aves que migran desde el norte hasta la Antártica se encuentran Phalacrocoracidae, Procellariidae y Sternidae (Thomazelli *et al.*, 2010) los dos últimos pertenecen al orden Charadriiformes. Farley *et al.*, (2001) realizó un estudio serológico en cormoranes, los que pertenecen al primer grupo, de los cuales un 47% poseían anticuerpos para el NDV.

Una de las aves que se cree que son de mayor importancia para la diseminación de estos virus entre la Antártica y regiones templadas son los salteadores o skúas (*Stercorarius spp.*), debido a sus conductas alimentarias. Estos ingieren animales muertos, depredan pichones y huevos de pingüinos, y debido a este contacto directo podrían adquirir la infección (Austin y Webster, 1993; Davis y Miller, 1992; Thomazelli *et al.*, 2010). Además, se han encontrado anticuerpos contra influenza y paramixovirus en un salteador polar (*Stercorarius maccormicki*) y en pingüinos de Adelia localizados en el Mar de Ross, aproximadamente 2.500 km de la Antártica chilena (Pearce y Wilson, 2003).

En el caso del NDV, el mayor riesgo de transmisión ocurre a través de la actividad humana, ya sea por transferencia mecánica o fomites (material, equipo, vestimenta, zapatos u otros elementos contaminados). La comercialización de aves y sus productos fueron fundamentales en la diseminación del virus desde los países infectados, pero esto va en retroceso debido a la implementación de cuarentenas y ensayos diagnósticos.

Por otra parte, el tráfico ilegal sigue siendo un grave problema a nivel mundial, presentando un riesgo para la diseminación de cepas virulentas de Newcastle. Se describe que la transmisión debida al movimiento de aves silvestres es mucho menos común (Maclachlan *et al.*, 2017)

En el **anexo 2** podemos encontrar un diagrama que resume las posibles formas de diseminación del *Avian avulavirus 19*.

ESPECIES DE PINGÜINOS RESIDENTES DE LA ANTÁRTICA

Pingüino Papúa (*P. papua*): Vive en mares Antárticos y evita zonas de mar congelado. En el Archipiélago de Tierra del Fuego se puede encontrar en bocas de estrechos. Es pelágico en canales e islas australes. Mide entre 76-80 cm de largo, posee una banda blanca que une los ojos pasando por sobre la corona y un pico rojo. Come peces pequeños. Vive en colonias distantes de la playa a las que vuelve anualmente con leves cambios. Es un excelente buceador de profundidad (Martínez y González, 2004; Couve *et al.*, 2016).

Pingüino de Adelia (*P. adeliae*): Exclusivo de aguas Antárticas. Es pelágico, pero nidifica en islas. Mide 71 cm de largo, es el más pequeño de los que viven en la Antártica. Se mueve en grupos, es territorial y agresivo. Deben recorrer grandes distancias para llegar a sus sitios de nidificación. Salta varios metros fuera del agua, puede descansar sobre témpanos (Martínez y González, 2004; Couve *et al.*, 2016).

Pingüino de barbijo (*P. antarctica*): Su distribución es estrictamente Antártica. Su hábitat es pelágico. Realiza sus nidos a mayor altura, en comparación a otros pingüinos. Se interna accidentalmente en aguas fueguinas como el Canal Beagle. Posee una altura de 76 cm, lo caracteriza una delgada línea negra que inicia detrás de los ojos y rodea la garganta. Es gregario y muy agresivo con otros pingüinos (Martínez y González, 2004; Couve *et al.*, 2016).

Otras especies de pingüinos que también habitan la Antártica incluyen a: pingüino rey (*Aptenodytes patagonicus*), pingüino emperador (*Aptenodytes forsteri*), pingüino Macaroni (*Eudyptes chrysolophus*) (Couve *et al.*, 2016; Martínez y González, 2004), pero estos no serán descritos debido a que no se encontraron en los sitios de muestreo. Otras especies de aves y mamíferos del territorio Antártico se encuentran en el **anexo 3**.

Esta investigación es relevante y actual, dado que es el primer trabajo en donde se investiga la seroprevalencia de *Avian avulavirus 19*.

HIPÓTESIS

Los pingüinos *Pygoscelis* spp. de diferentes lugares de la Antártica, presentan infección por *Avian avulavirus 19*.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la infección de *Avian avulavirus 19* en diferentes especies de pingüino, en el Territorio Antártico Chileno.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la infección de *Avian Avulavirus 19* en 3 especies de pingüinos del género *Pygoscelis* (*P. papua*, *P. adeliae* y *P. antarctica*) presentes en 7 localidades del Territorio Antártico Chileno.
2. Comparar resultados de acuerdo con lugar y especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y procesamiento de muestras

Las muestras fueron obtenidas a través del proyecto de investigación INACH 46-16. Durante los meses de enero y febrero del año 2017, se realizó la toma de muestras sanguíneas y ambientales en diferentes sitios (Fig. 3, Cuadro 1). La punción se realizó en la vena digital plantar común. Luego estas muestras sanguíneas fueron centrifugadas a 3.000 revoluciones por minuto (R.P.M.) para obtener los sueros.

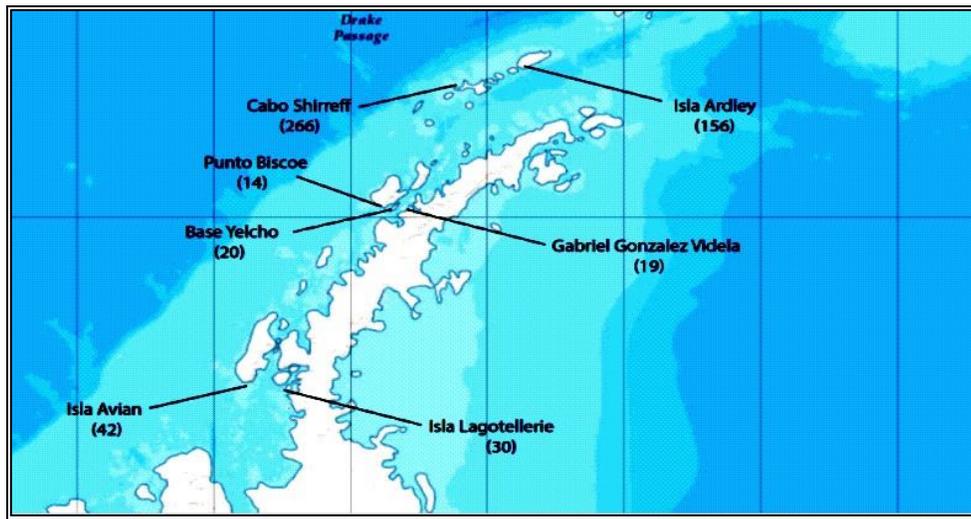


Figura 3: Mapa de la península Antártica donde se indica la ubicación de los sitios de muestreo, junto con la cantidad de muestras obtenidas.

| Ubicación | Nº de sueros |
|---|--------------|
| Bahía Paraíso, Base Gabriel González Videla (GGV) | 17 |
| Isla Doumer, Base Yelcho | 20 |
| Punta Biscoe (Isla Anvers) | 14 |
| Avian Island | 39 |
| Isla Lagotellerie | 27 |
| Cabo Shirreff | 251 |
| Isla Ardley | 128 |
| Total | 496 |

Cuadro 1: Ubicaciones que formaron parte del muestreo y cantidad de muestras de suero que finalmente formaron parte del análisis serológico realizado en esta investigación.

Es importante recalcar que el lugar de estudio se encuentra protegido por el Tratado Antártico (Chile Min. RREE, 1962), el cual fue suscrito en Washington, EE. UU., el 1 de diciembre de 1959, en el **anexo 4** se encuentra el listado de los Estados que forman parte de este Tratado. En él se crean las zonas Antárticas especialmente protegidas (ZAEP, en inglés ASPA), lo que implica que se debe requerir un permiso especial para cualquier tipo de investigación científica en el área. Los certificados de bioseguridad y bioética se encuentran en el **anexo 5**.

Inactivación de suero

Se realizó el protocolo de acuerdo con Direksin *et al.*, 2002 que se inicia agregando 100 μL de muestra en tubos de ensayo de 5 mL, se coloca una muestra en cada tubo y se incuban a 56°C por 30 minutos. Luego se agregaron 600 μL de caolín (silicato de aluminio hidratado) al 25% en BBS. El protocolo de preparación de BBS se encuentra en el **anexo 6**. Luego, se agita brevemente y se incuba por 30 minutos a temperatura ambiente. Este procedimiento elimina posibles agentes naturales inespecíficos que inhiben la hemaglutinación. Luego se centrifugó a 3.000 R.P.M por 20 minutos, lo que precipita el caolín. Posteriormente se agregó 600 μL de sangre entera de pavo al 20% diluida en Buffer fosfato salino (PBS). Se incubó durante 120 minutos a temperatura ambiente y nuevamente se centrifuga por 20 minutos a 3.000 R.P.M., para precipitar los glóbulos rojos. Se considera que el suero está en una dilución de 1:10.

Prueba de hemaglutinación (HA)

Esta prueba permite la titulación viral del aislado propagado de *Avian avulavirus 19*. Consiste en usar la actividad hemaglutinante del virus contenida en la proteína hemaglutinina-neuroaminidasa (HN). Brevemente, en una placa de 96 pocillos en fondo V, se realizaron diluciones seriadas de las muestras en base 2, las que luego se mezclaron con 50 μL de eritrocitos de pavo al 0.5% (diluido en PBS). Luego de 45 minutos de incubación, la placa se analizó en busca de actividad hemaglutinante (Figura 4). El título del virus es el recíproco de la última dilución en la cual se observa hemaglutinación. El título viral es expresado en unidades hemaglutinantes cada 50 μL (UHA/50 μL) (Knipe y Howley, 2013).

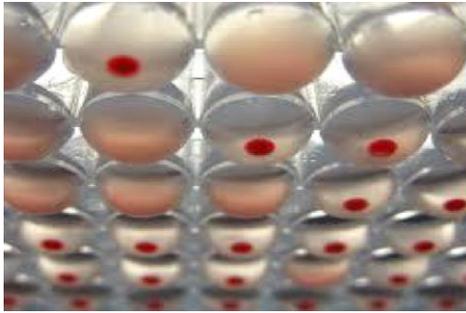


Figura 4: Se observan los resultados obtenidos en la prueba de HA. Los pocillos de un rojo difuso corresponden a los positivos y los que tienen un punto rojo en el fondo, que al inclinar la placa escurren, corresponden a los negativos (imagen obtenida en Del Río, 2017).

Técnica de inhibición de la hemaglutinación (HI)

Es una prueba que se utiliza para realizar identificación de anticuerpos de virus que tienen actividad hemaglutinante. En el caso de los paramixovirus aviares, la hemaglutinación es producto de la unión de la proteína hemaglutinina-neuroaminidasa (HN) a los eritrocitos de pavo. La inhibición de la hemaglutinación se produce en animales que generaron anticuerpos contra la proteína HN, ya que estos inhiben la unión de la proteína a los eritrocitos. Esta prueba es de carácter cuantitativo, ya que permite detectar y estimar la cantidad de anticuerpos específicos (en el caso de que estén presentes) en suero, plasma o yema de huevo. Para la realización de esta prueba primero se diluye el suero problema en base 2 en una placa de 96 pocillos con fondo V, en un volumen de 25 μL . Luego se deposita en cada pocillo 25 μL de virus en una concentración de 80 UHA, incubándose por 45 minutos a temperatura ambiente. El detalle de la propagación del virus se encuentra en el **anexo 7**. En esta etapa los anticuerpos se unen al antígeno del virus, si es reconocido, es decir, si poseen una unión antigénica. Luego se agregan los glóbulos rojos (50 μl de sangre de pavo al 0,5%), con el fin de evidenciar si existen virus libres de la unión con los anticuerpos. Los anticuerpos específicos bloquean la unión del virus al glóbulo rojo, por ende, bloquea la hemaglutinación. Los resultados son positivos cuando se observa al fondo de la placa un punto rojo precipitado, en cambio los negativos se ven de un rojo homogéneo. Por lo que los resultados se observan de la misma forma que en la *figura 4*, pero se interpretan a la inversa. Al inclinar la placa, los positivos escurren, lo que no ocurre con los negativos. El título del suero es igual al recíproco de la mayor dilución que produce una completa inhibición de la hemaglutinación (Spackman, 2014). Es procedente indicar que se consideraron como positivos los sueros en los cuales se obtuvo un título ≥ 40 UHA/50 μL . Cada análisis se hizo en duplicado.

Análisis estadístico y presentación de resultados

En los sitios donde se obtuvieron escasas muestras, se pudo aproximar (según el número de muestras) cuál es la prevalencia mínima por especie que hay en ese sitio detectando al menos un individuo positivo, esto se resume en la Cuadro 2. Esto se debe a las dificultades metodológicas que implica un muestreo en la Antártica. Para realizar este cálculo, se asume que la prueba es imperfecta. Este análisis se realizó en el programa EpiTools de Ausvet (Sergeant, 2017).

| Sitio de muestreo | Especie | Muestras para HI | Nivel de detección $\geq a$: |
|--------------------------|-------------------|------------------|-------------------------------|
| Avian Island | <i>P. adeliae</i> | 39 | 7,5% |
| Gabriel González V. | <i>P. papua</i> | 17 | 17% |
| I. Doumer (Yelcho) | <i>P. papua</i> | 20 | 14,5% |
| Punta Biscoe (I. Anvers) | <i>P. adeliae</i> | 14 | 20% |
| I. Lagotellerie | <i>P. adeliae</i> | 27 | 10,8% |

Cuadro 2: Muestras utilizadas en HI y el nivel de prevalencia mínima aproximada en el caso de detectar un individuo positivo en las diferentes poblaciones.

En el caso de Shirreff, con una población estimada de 8052 individuos, si se realiza el cálculo basado en una distribución binomial, se debe seleccionar una muestra con al menos 190 individuos (en esta ocasión se muestrearon 206 barbijo) para calcular una proporción estimada del 50% con un nivel de confianza del 99,5% y una amplitud del intervalo de confianza igual al doble del error aceptado (20%). En el caso de Ardley, con una población de 10.000 individuos se requerirían 121 individuos como mínimo (se muestrearon 128) para lograr una significancia estadística del 97,5% con el mismo nivel de error. En el caso de ambos cálculos se asume un muestreo aleatorio y un diagnóstico perfecto. Para estos análisis, se utilizó el programa Working in Epidemiology (WINEPI, 2006).

Los resultados de HI fueron visualizados a través de gráficos y Cuadros, usando como criterio, la ubicación de muestreo y la especie muestreada. Los resultados fueron analizados usando Cuadros de contingencia, comparando lugares y especies. Para realizar estos cálculos se utilizó el programa GraphPad Prism 6.

RESULTADOS

De un total de 496 muestras procesadas solo 45 resultaron positivas (9%). De las tres especies de pingüino incluidas, en todas ellas se encontró al menos un espécimen positivo. En el caso de pingüino de Adelia 1 de 80 (1,25%) fue positivo, de los pingüinos de barbijo 30 de 206 (14,6%), y de los pingüinos de Papúa 14 de 210 (6,7%) (*Fig. 5*).

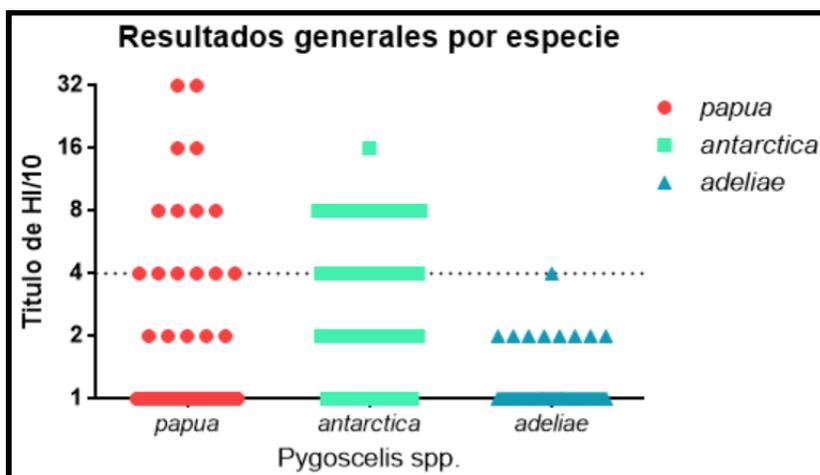


Figura 5: Gráfico de resultados generales por especie. Se debe explicar que tanto los títulos de <10 y 10 se representaron con título 1 de HI/10, para graficarlos con mayor facilidad, esto no altera los resultados ya que ambos valores son negativos.

De los 7 sitios que formaron parte de este estudio, las Islas Ardley, Avian y Lagotellerie resultaron negativas. En la primera se tomaron muestras de pingüinos de Papúa, mientras que en las otras dos, de pingüino de Adelia. En Punta Bischoe se analizaron 14 muestras de pingüino de Adelia obteniéndose solo 1 positivo (7,1%). En Isla Doumer, de 20 muestras procesadas de Papúa, tan solo 2 muestras resultaron positivas (10%). Por su parte, las muestras de pingüinos de Papúa obtenidas en las colonias situadas en la Base Gabriel González Videla, Bahía paraíso 9 de 17 (52,9%) fueron positivas, encontrándose en este lugar la mayor proporción de animales positivos. Finalmente, en el Cabo Shirreff, Isla Livingston 33 de 251 (13,1%) muestras resultaron positivas (*Figura 6*). Los sitios de muestreo y la proporción de animales positivos/total se ilustran en la *figura 7*.

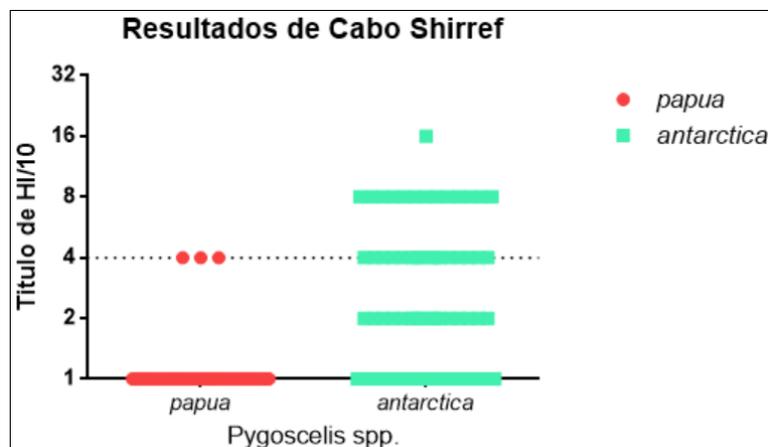


Figura 8
Resultados del cabo Shirref.

En detalle, solo se obtuvo 1 pingüino de Adelia positivo, este fue muestreado en Punta Biscoe, que a su vez fue el único resultado positivo de este lugar, con un título de 40 UHA/50 μ L. En cuanto a los pingüinos de barbijo, se obtuvieron 28 sueros positivos de 206, todos provenientes del Cabo Shirreff. Por último, 12 sueros de Papúa resultaron positivos, obtenidos de Bahía Paraíso (7), I. Doumer (2) y Shirreff (3).

Con estos resultados y con las estimaciones previamente establecidas para las localidades en las que se obtuvieron una menor cantidad de muestras, podemos estimar una prevalencia de al menos un 20% en Punta Biscoe; mayor o igual 14,5% para la Isla Doumer; mientras que en Bahía Paraíso la prevalencia debe ser mayor al 17% (que a su vez fueron las mayores concentraciones de anticuerpos obtenidas en la investigación). En los sitios donde se obtuvieron resultados negativos la prevalencia debe ser menor al 7,5% para Avian Island y menor al 10,8% para Lagotellerie. En el caso del Cabo Shirref, donde se obtuvo una mayor cantidad de muestras de pingüinos de barbijo, se pudo establecer una prevalencia verdadera del 14,6% con 30 positivos de 206 con un nivel de confianza del 99,5%. En la Isla Ardley, también se obtuvo una gran cantidad de muestras, como para realizar una prevalencia estadísticamente significativa, pero no se encontró evidencia de infección.

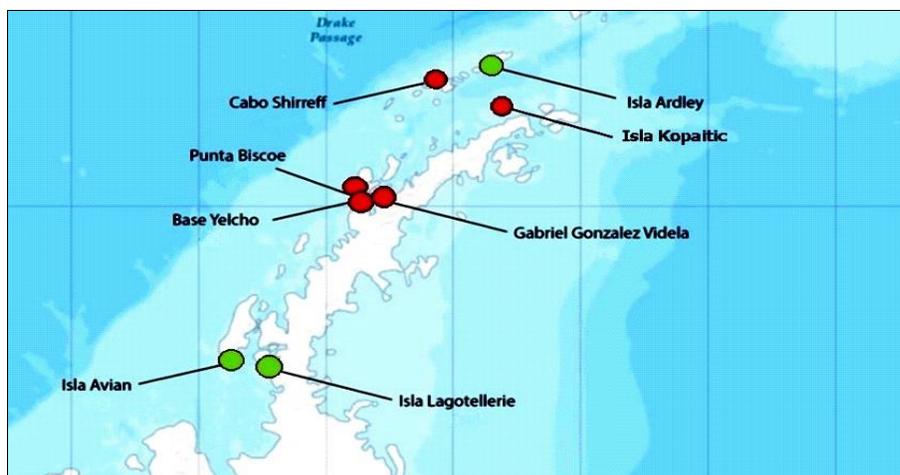


Figura 9: Ubicación de Kopaitic y resultados de forma resumida. Los puntos rojos son sitios con evidencia de infección y los verdes sin evidencia.

Análisis estadístico

Como parte de este análisis, se presenta a continuación una Cuadro de resumen de los valores obtenidos en el HI por sitio muestreado (*Cuadro 3*). También para este análisis se consideraron los valores de <10 como 10.

Para la realización del análisis de varianza (ANOVA) se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis, que permite la comparación de datos no paramétricos, como los de esta investigación. Este test, permite establecer diferencias estadísticas entre los promedios obtenidos por sitio.

Luego, para establecer donde se encuentran estas diferencias, se realizan comparaciones múltiples a través del test de Dunn que se presentan en la *Cuadro 4*.

| Sitio | Promedio | Desviación estándar | Mínimo | Máximo | Conteo |
|----------------------|----------|---------------------|--------|--------|--------|
| Ardley | 10,23 | 1,76 | 10 | 20 | 128 |
| Isla Avian | 10,00 | 0 | 10 | 10 | 39 |
| Lagotellerie | 10,37 | 1,92 | 10 | 20 | 27 |
| Punta Biscoe | 17,14 | 8,25 | 10 | 40 | 14 |
| Cabo Shirreff | 17,13 | 19,19 | 10 | 160 | 251 |
| Isla Doumer (Yelcho) | 19,00 | 33,85 | 10 | 160 | 20 |
| Bahía Paraíso (GGV) | 76,47 | 100,37 | 10 | 320 | 17 |
| Total | 16,53 | 26,41 | 10 | 320 | 496 |

Cuadro 3
Resumen de los valores de HA obtenidos por sitio.

| | GGV | Ardley | Lagotellerie | Doumer | Shirreff | Avian | Biscoe |
|--------------|-----|-----------------|-----------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| GGV | | P≤0,0001 | P≤0,0001 | P≥0,9999 | P≤0,0001 | P≤0,0001 | P≥0,9999 |
| Ardley | | | P≥0,9999 | P= 0,0009 | P= 0,0004 | P≥0,9999 | P≤0,0001 |
| Lagotellerie | | | | P= 0,0018 | P= 0,6784 | P≥0,9999 | P≤0,0001 |
| Doumer | | | | | P= 0,0120 | P= 0,0009 | P≥0,9999 |
| Shirreff | | | | | | P= 0,0377 | P= 0,0004 |
| Avian | | | | | | | P≤0,0001 |
| Biscoe | | | | | | | |

Cuadro 4
Comparaciones múltiples realizadas con test de Dunn. Se indica el valor de P, en negrita se observan los valores que son estadísticamente significativos ($\leq 0,05$).

A través de este análisis, se pudieron reconocer tres grupos estadísticos como se observa en la *figura 6*. En el grupo A, se encuentran Gabriel González Videla, Doumer y Punta Biscoe; en el grupo B se encuentra Cabo Shirreff y en el C Ardley y Avian Island. Lagotellerie se comporta como mixto BC. Entonces, en A se encontrarían los con mayor concentración de anticuerpos, en C los con menor concentración y B serían intermedios.

Por otro lado, se realizó una prueba de Chi cuadrado para ver las diferencias estadísticas que posiblemente existen en las dos especies de pingüinos presentes en el Cabo Shirreff. En El análisis se obtuvo un valor de $p=0,15$ lo cual indica que no existen diferencias estadísticas entre ambas especies en este lugar, lo que indicaría que el virus tendría una afinidad similar en ambas especies, al menos en Shirreff. Este cálculo se realizó a través de Social Science Statistics, 2018. Los datos ingresados se muestran en la *Cuadro 5*.

| Especies en Shirreff | Positivos | Negativos | Total fila |
|----------------------|-----------|-----------|----------------------|
| Papúa | 3 | 42 | 45 |
| barbijo | 30 | 176 | 206 |
| Total columna | 33 | 218 | 251 (Total muestras) |

Cuadro 5
Chi cuadrado realizado con datos de Shirreff

DISCUSIÓN

La Antártica pareciera ser un lugar prístino y lejano, pero el incremento en la interconectividad global, el aumento de los viajes y las personas que visitan regiones polares podrían resultar en la introducción de patógenos de forma involuntaria (Nara *et al.*, 2008; Thomazelli *et al.*, 2010). Este es el caso del NDV (presente en la Antártica (Thomazelli *et al.*, 2010)), dado que el mayor responsable de su transmisión es el humano, ya sea por transferencia mecánica o fómites (Maclachlan *et al.*, 2017). A esto se debe sumar los efectos que pudiese tener el cambio climático al alterar los patrones migratorios de los animales, lo que podría resultar en introducción de vectores y diseminación de enfermedades a nuevos lugares (Thomazelli *et al.*, 2010).

Hay mucho aún que desconocemos sobre el rol ecosistémico de los virus de la Antártica. Dado que el Avian avulavirus 19 fue recientemente descubierto en isla Kopaitic (base O'Higgins) (Neira *et al.*, 2017), se desconoce si es patógeno o no, aunque todos los animales que formaron parte del muestreo se encontraron sin signos clínicos.

En la *Figura 9* se puede observar la ubicación de la Isla Kopaitic y los resultados de esta investigación de forma resumida. Se puede observar que se obtuvieron resultados negativos en la parte sur del territorio, mientras que en la parte centro norte del mapa se encuentran los resultados positivos, a excepción de Ardley. Es importante recalcar que la mayoría de los pingüinos muestreados en Ardley son juveniles previos a su primer forrajeo en el mar (130/156), dada su corta edad tienen menor probabilidad de encuentro con patógenos, por lo que no son buenos sujetos de estudio. Se requeriría tomar más muestras de adultos para descartar completamente la infección en el sitio.

En cuanto a las distancias de los sitios de muestreo hasta Kopaitic, la más cercana es Ardley (145 km), luego vienen Bahía Paraíso (288 km), Isla Doumer (326 km) y Biscoe (328 km), y las más lejanas son Lagotellerie (671 km) y Avian Island (718 km). Estas mediciones se realizaron a través de Google Earth.

En cuanto a los resultados obtenidos, cabe recalcar que en Bahía Paraíso e Isla Doumer son los lugares de mayor interacción de los pingüinos con los humanos, ambos se encuentran relativamente cerca y se encuentran en la zona media del continente Antártico, zona que

destaca por sus resultados positivos (*Fig. 9*). Estos dos sitios se encuentran entre los 3 lugares con mayor concentración de anticuerpos (junto con Shirref) (*Fig. 6*). Cabe preguntarse el porqué de esta situación, y quizás se deba a que estos individuos tuvieron una infección más reciente en comparación a los otros.

También sería importante analizar por qué se encuentran negativos los puntos al sur del continente, puede ser porque éstos se encuentran lejanos a los sitios de infección, o podría deberse también a aspectos climáticos (*fig. 9*). Se desconoce la temperatura mínima a la que los paramixovirus siguen infectivos, pero si se sabe que se puede aislar NDV desde carcasas enterradas por hasta 121 días, y en el caso de carcasas congeladas (que podría ser el caso de la Antártica) por más de 730 días (Pirtle y Beran, 1991).

Es interesante saber cual es la movilidad de los pingüinos y si estos tienen contacto entre sí, ya que cabe la posibilidad de que sean ellos los diseminadores de este virus en los territorios Antárticos y Subantárticos. Los pygoscelidos comparten similitudes en su distribución geográfica (en general, evitan zonas de mar congelado) y tienen preferencia por los mismos sitios de anidación (playas y laderas rocosas; Couve *et al.*, 2016) por lo que existe probabilidad de contagio en tierra. En el mar poseen habilidades equivalentes, la distancia recorrida y la velocidad de nado es muy similar entre estas especies: de 15-45 kms y 7-8 kms/H respectivamente (Wilson *et al.*, 1989). Pero estos pingüinos poseen diferencias tanto en el tiempo de crianza, en las conductas de forrajeo y en sus tácticas de vida, lo que produce una segregación ecológica. Se sabe también que los *Pygoscelis spp.* son más eficientes forrajeando a distintas profundidades. Por lo que al integrar este y otro parámetros (área de superposición y superposición de periodos de forrajeo) se concluyó que existe una mínima superposición y que los pingüinos buscan explotar diferentes nichos, pero que finalmente esto no siempre resultaría en una reducción de la competencia si existe una alta movilidad del krill (Wilson, 2010). Sin embargo, Trivelpiece *et al.*, (1987) describen que no se encontró evidencia de que el nicho de las tres especies se hubiera visto comprometido por competencia alimentaria, por lo que la probabilidad de encuentro en el mar sería menor. En cuanto a la época de migración, en orden decreciente de distancias recorridas según la literatura, estarían en primer lugar los pingüinos de Adelia realizando migraciones de no menos de 5.000 kms (Davis *et al.*, 1996), luego los barbijos, que en un estudio de telemetría ejecutado en una

misma colonia, observaron que 2 de los 6 pingüinos estudiados realizaron migraciones de 800 y 1.500 kms de distancia, se estipuló que las diferencias se deberían a distintas poblaciones de origen (Trivelpiece *et al.*, 2007); Y por último, se encontrarían los Papúa con la máxima distancia registrada durante el invierno de 268 km (Wilson *et al.*, 1998).

Por otra parte, se sabe que las aves acuáticas migrantes son importantes diseminadores de los paramixovirus en el ambiente (Fornells *et al.*, 2012). Dentro de las familias relevantes se encuentran Procellariidae, Phalacrocoracidae, Sternidae y Stercoraciidae (Thomazelli *et al.*, 2010). De estos, los salteadores serían los más relevantes, debido al contacto directo de depredación que tienen sobre los huevos y pichones de pingüinos (Austin y Webster, 1993; Davis y Miller, 1992; Thomazelli *et al.*, 2010). Por ende, sería relevante continuar realizando estudios de la presencia de este y otros virus en estas familias de aves. En el **anexo 2**, se observan posibles formas de transmisión, de acuerdo con lo ya mencionado.

Una limitación que se debería considerar sobre este trabajo es la poca cantidad de muestras obtenidas en la mayoría de los sitios (exceptuando Shirreff y Ardley). Esto se debe principalmente a la dificultad asociada a realizar investigación en la Antártica, dado que en algunos sitios los investigadores solo poseían de un par de horas para realizar la toma de muestras.

CONCLUSIONES

La hipótesis de esta investigación resultó verdadera, pues los pingüinos presentes en 4/7 sitios mostraron evidencia de infección contra *Avian avulavirus 19*.

Para la mejor comprensión de los resultados, el territorio muestreado se dividió en tres zonas: norte, centro y sur. En la zona norte, solo el Cabo Shirref resultó positivo, en la zona centro (que incluye 3 sitios de muestreo) se obtuvo fuerte evidencia serológica, mientras que la zona sur no presentó evidencia serológica de infección.

En cuanto a los resultados por especie, los Papúa obtuvieron la mayor concentración de anticuerpos con 32 UHA/10. Pero los que obtuvieron una mayor proporción de positivos fueron los de barbijo con un 14,6% (*versus* el 6,7% de Papúa). Finalmente, los de Adelia obtuvieron una proporción de positivos intermedia (9%), pero fueron muestreados en una menor cantidad en relación con las especies anteriores.

En cuanto al análisis estadístico de los sitios muestreados, se lograron identificar tres grupos. Estos se encuentran en orden alfabético de mayor a menor concentración de anticuerpos. En el grupo A: Bahía Paraíso, Isla Doumer y Punta Biscoe. En el grupo B: Cabo Shirreff. En el C: Ardley y Avian Island. Lagotellerie se comporta como B y C.

Sería interesante que a futuro se realicen estudios en donde se determine la mínima temperatura en la que se encuentra infectivo el AVA 19, dado que las bajas temperaturas podrían beneficiar a este virus envuelto. Esta información podría ayudar a determinar el riesgo de transmisión del virus entre distintos ambientes. Además, aún queda mucho por descifrar en cuanto a la transmisión de este virus recientemente descubierto. Finalmente, tampoco se sabe si este es un agente patógeno o no, lo que es relevante para determinar el posible impacto que tendría en la conservación de éstas y otras especies blanco.

BIBLIOGRAFÍA

- AGUIRRE, A.; OSTFELD, R.; TABOR, G.; HOUSE, C.; PEARL, M.** 2002. Conservation medicine: ecological health in practice. Oxford University Press. Nueva York, Estados Unidos. 432 pp.
- ALEXANDER, D.** 2000. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Revue Scientifique Et Technique*.19:443–62.
- AUSTIN, F.; WEBSTER, R.** 1993. Evidence of ortho and paramyxoviruses in fauna from Antarctica. *Journal of Wildlife Diseases*. 29(4):568-571.
- BUI, V.; MIZUTANI, T.; NGUYEN, T.; TRINH, D.; AWAD, S.; MINOUNGOU, G.; YAMAMOTO, Y.; NAKAMURA, K.; SAITO, K.; WATANABE, Y.; RUNSTADLER, J.; HUETTMANN, F.; OGAWA, H.; IMAI, K.** 2014. Characterization of a genetic and antigenic variant of avian paramyxovirus 6 isolated from a migratory wild bird, the red-necked stint (*Calidris ruficollis*). *Archives of Virology*. 159(11):3101-3105.
- CHILE. MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES.** 1962. Decreto Supremo N°174 Tratado Antártico. 2 diciembre 1961.
- CLARK, K.; NILES, L.; BURGER, J.** 1993. Abundance and distribution of migrant shorebirds in Delaware Bay. *The Condor: Ornithological Applications*. 95: 694–705.
- COFFEE, L.; HANSON, B.; LUTTRELL, M.; SWAYNE, D.; SENNE, D.; GOEKJIAN, V.; NILES, L.; STALLKNECHT, D.** 2010. Avian paramyxoviruses in shorebirds and gulls. *Journal of Wildlife Diseases*. 46(2):481-487.
- COUVE, E.; VIDAL, C.; RUIZ, J.** 2016. Aves de Chile sus islas oceánicas y península Antártica. Far south. Punta Arenas, Chile. 554 pp.
- DAVIS, L.; BOERSMA, P.; COURT, G.** 1996. Satellite telemetry of the winter migration of Adélie penguins (*Pygoscelis adeliae*). *Polar Biology*. 16(3):221-225.
- DAVIS, L.; MILLER, G.** 1992. Satellite tracking of Adelie penguins. *Polar Biology*. 12:503-506.
- DEL RÍO, J.** 2017. Detección e identificación de paramixovirus aviáres en pingüino papúa (*Pygoscelis papua*) del territorio Antártico chileno. Tesis para optar al título de Médico Veterinario y grado de Magíster. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.
- DIREKSIN, K.; JOO, H.; GOYAL, S.** 2002. An inmunoperoxidase monolayer assay for the detection of antibodies against swine influenza virus. *Journal of veterinary diagnostic investigation*. 14(2):169-171.

FARLEY, J.; ROMERO, C.; SPALDING, M.; AVERY, M.; FORRESTER, D. 2001. Newcastle disease virus in double-crested cormorants in Alabama, Florida, and Mississippi. *Journal of Wildlife Diseases*. 37 (4):808–812.

FORNELLS, L.; SILVA, T.; BIANCHI, I.; TRAVASSOS, C.; LIBERAL, M.; ANDRADE, C.; PETRUCCI, M.; VEIGA, V.; VASLIN, M.; COUCEIRO, J. 2012. Detection of paramyxoviruses in Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*) on the Brazilian tropical coast. *Veterinary Microbiology*. 156: 429–433.

GORAICHUK, I.; DIMITROV, K.; SHARMA, P.; MILLER, P.; SWAYNE, D.; SUAREZ, D.; AFONSO, C. 2017. Complete Genome Sequences of Four Avian Paramyxoviruses of Serotype 10 Isolated from Rockhopper Penguins on the Falkland Islands. *Genome Announcements*. 5(22):1-2.

HLINAK, A.; MÜHLE, R.; WERNER, O.; GLOBIG, A.; STARICK, E.; SCHIRRMEIER, H.; HOFFMANN, B.; ENGELHARDT, A.; HÜBNER, D.; CONRATHS, F.; WALLSCHLAGER, D.; KRUCKENBER, G.; MÜLLER, T. 2006. A virological survey in migrating waders and other waterfowl in one of the most important resting sites of Germany. *Journal of Veterinary Medicine Series B*. 53: 105–110.

HYUN-JEONG, L.; JI-YE, K.; YOUN-JEONG, L.; EUN-KYUN, L.; BYOUNG-MIN, S.; HEE-SOO, L.; KANG-SEUK, C. 2017. A Novel Avian Paramyxovirus (Putative Serotype 15) Isolated from Wild Birds. *Frontiers in Microbiology*. 8(786):1-9.

ICTV. 2016. Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2016. *Archives of Virology*. 161:2351–2360.

ICTV. 2018. Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2018. *Archives of Virology*. [En línea] <<https://doi.org/10.1007/s00705-018-3814-x>> [consulta: 10-05-2018].

KARAMENDIN, K.; KYDYRMANOV, A.; SEIDALINA, A.; ASANOVA, S.; SAYATOV, M.; KASYMBEKOV, E.; KHAN, E.; DAULBAYEVA, K.; HARRISON, S.; CARR, I.; GOODMAN, S.; ZHUMATOV, K. 2016. Complete genome sequence of a novel avian paramyxovirus (APMV-13) isolated from a wild bird in Kazakhstan. *Genome Announcements*. 4(3):167–16.

KNIPE, D.; HOWLEY, P. 2013. *Fields virology*. 6ta edición, volumen 1. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, EEUU. Cap 33 pag 957.

KUHN, J.; VERDUGO, C.; NG, T.; KUMAR, S.; CHOI, K.; MATSUMIYA, L.; NEIRA, V. 2017. Six (6) new species in the genus Avulavirus (Mononegavirales: Paramyxoviridae) [en línea] <https://talk.ictvonline.org/files/proposals/animal_dsrna_and_ssna_viruses/m/animal_rna_minus_ec_approved/6948> [consulta: 16-08-2017].

MACLACHLAN, N.; DUBOVI, E.; BARTHOLD, S.; SWAYNE, D.; WINTON, J. 2017. Paramyxoviridae and Pneumoviridae. In: Fenner's Veterinary Virology. Quinta edición. Academic press. Londres, Reino Unido. Pp: 327-356

MARTÍNEZ, D.; GONZÁLEZ, G. 2004. Las aves de Chile, nueva guía de campo. Ediciones del naturalista. Chile. 620 pp.

NARA, P.; NARA, D.; CHAUDHURI, R.; LIN, G.; TOBIN, G. 2008. Perspectives on advancing preventative medicine through vaccinology at the comparative veterinary, human and conservation medicine interface: Not missing the opportunities. *Vaccine*. 26(49):6200-6211.

NEIRA, V.; TAPIA, R.; VERDUGO, C; BARRIGA, G.; MOR, S.; FEI, T.; GARCÍA, V.; DEL RÍO, J.; RODRIGUES, P.; BRICEÑO, C.; MEDINA, R.; GONZÁLEZ, D. 2017. Novel Avulaviruses in penguins, Antarctica. *Emerging Infectious Diseases* 23(7):1212-1214.

PEARCE, D.; WILSON, W. 2003. Review: Viruses in Antarctic ecosystems. *Antarctic Science*. 15(3):319–331.

PIRTLE, E.; BERAN, G. 1991. Virus survival in the environment. *Scientific and Technical Review of the Office International des Epizooties*. 10(3):733-748.

SERGEANT, E. 2017. Epitools epidemiological calculators. [en línea] <<http://epitools.ausvet.com.au>> [consulta: 22-11-2017].

SOCIAL SCIENCE STATISTICS. 2018. Chi-Square Test Calculator. [en línea] <<http://www.socscistatistics.com/tests/chisquare2/Default2.aspx>> [consulta: 15-05-2018].

SPACKMAN, E. 2014. Animal influenza virus. Springer Science. Segunda edición. Nueva York, Estados Unidos. 425 pp.

THOMAZELLI, L.; ARAUJO, J.; OLIVEIRA, D.; SANFILIPPO, L.; FERREIRA, C.; BRENTANO, L.; PELIZARI, V.; NAKAYAMA, C.; DUARTE, R.; HURTADO, R.; BRANCO, J.; WALKER, D.; DURIGON, E. 2010. Newcastle disease virus in penguins from King George Island on the Antarctic region. *Veterinary Microbiology*. 146:155–160.

TRIVELPIECE, W.; BUCKELEW, S.; REISS, C.; TRIVELPIECE, S. 2007. The winter distribution of chinstrap penguins from two breeding sites in the South Shetland Islands of Antarctica. *Polar Biology*. 30(10):1231-1237.

TRIVELPIECE, W.; TRIVELPIECE, S.; VOLKMAN, N. 1987. Ecological Segregation of Adelie, Gentoo, and Chinstrap Penguins at King George Island, Antarctica. *Ecology*. 68(2): 351-361.

WILSON, R.; ALVARREZ, B.; LATORRE, L.; ADELUNG, D.; CULIK, B.; BANNASCH, R. 1998. The movements of gentoo penguins *Pygoscelis papua* from Ardley Island, Antarctica. *Polar Biology*. 19(6):407-413.

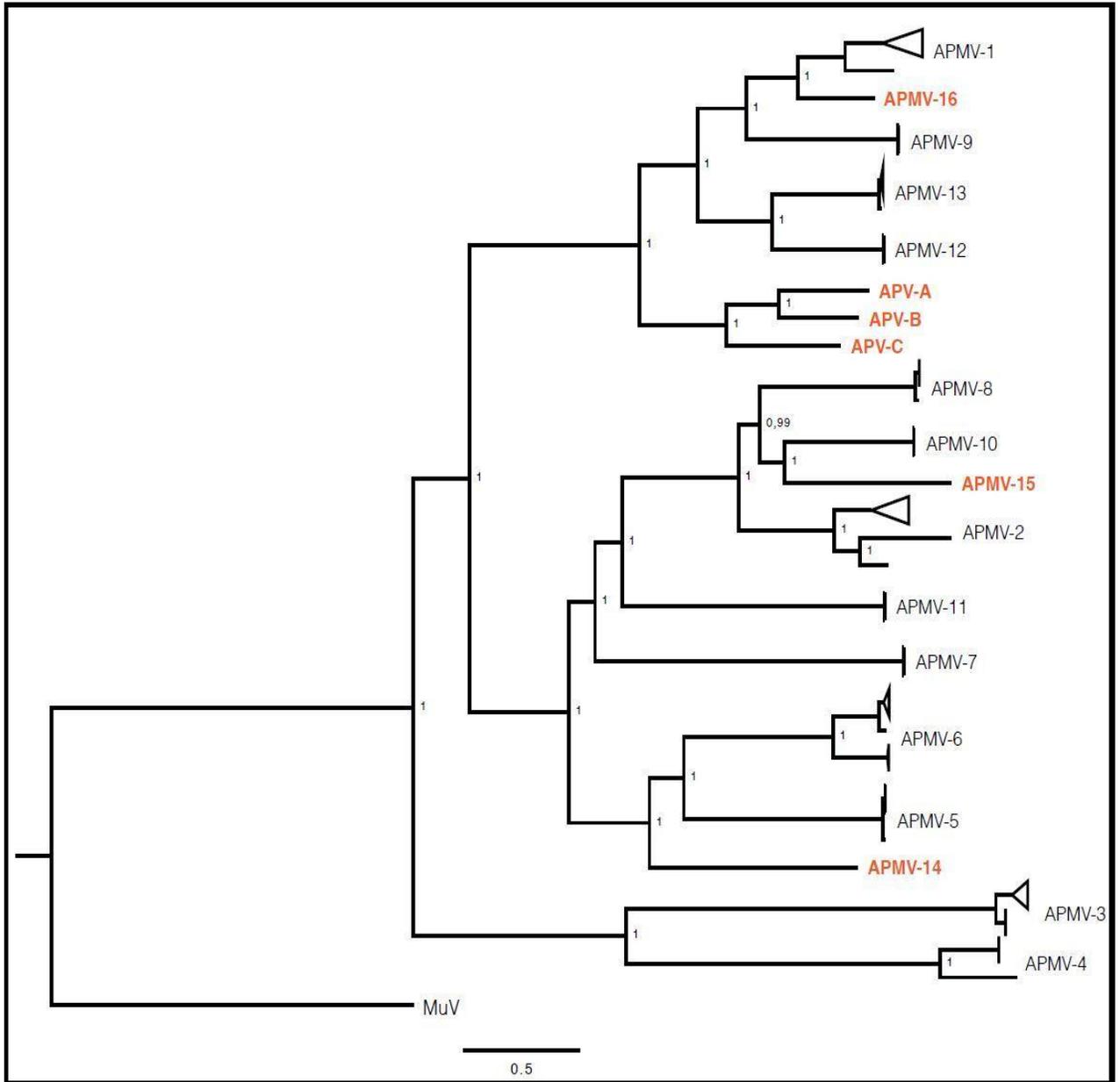
WILSON, R.; NAGY, K.; OBST, B. 1989. Foraging ranges of penguins. *Polar Record*. 25(155): 303-308.

WILSON, R. 2010. Resource partitioning and niche hyper-volume overlap in free-living Pygoscelid penguins. *Functional Ecology*. 24(3):646-657.

WINEPI. 2006. Tamaño de muestra: Estimar proporción. [en línea] <<http://www.winepi.net/f102.php>> [consulta: 20-05-2018].

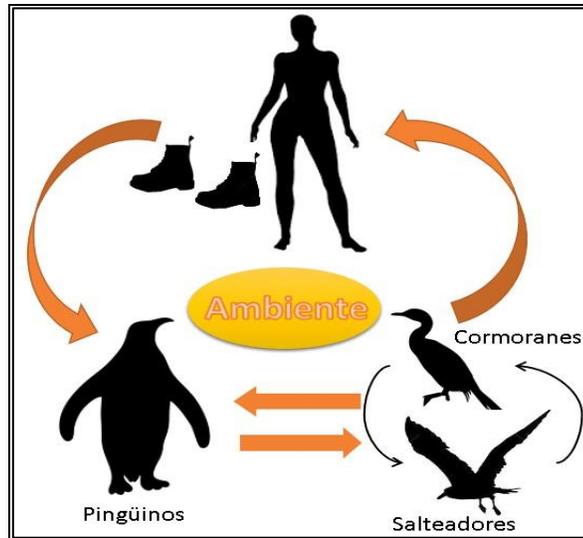
ZOHARI, S.; MUNIR, M. 2013. Avian Paramyxoviruses Serotype 1 to 10. **In:** Munir, M. *Mononegaviruses of Veterinary Importance: Pathobiology and molecular diagnosis*. Centre for Agricultural Bioscience International. 376 pp.

ANEXOS



Anexo 1: Árbol filogenético bayesiano

Se estudiaron 82 avulavirus, en el que se incluyeron las tres nuevas especies descubiertas (APV A, B y C en naranja). Este análisis incluyó las proteínas N, P, M, F, HN, L concatenadas. La barra de escala indica la sustitución nucleotídica por sitio.



Anexo 2: Resumen de las posibles formas de diseminación. Las aves migratorias que compartan territorio con los pingüinos o éstos mismos son una posible fuente de infección y de diseminación del virus a otros territorios; también lo son las personas (turistas, científicos u otros), que puedan estar actuando como fómites a través de materiales o calzado, posiblemente moviendo el agente a otros sitios.

Anexo 3: Otras especies presentes en los sitios de muestreo

Aves

- Playero de lomo blanco (*Calidris fuscicollis*)
- Cisne de cuello negro (*Cygnus melanocoryphus*)
- Cormorán Antártico (*Phalacrocorax bransfieldensis*)
- Gaviota dominicana o cocinera (*Larus dominicanus*)
- Gaviotín Antártico (*Sterna vittata*)
- Garza bueyera (*Bubulcus ibis*)
- Gaviota cocinera/dominicana (*Larus dominicanus*)
- Golondrina de mar de vientre negro (*Fregetta tropica*)
- Paloma Antártica (*Chionis albus*)
- Petrel gigante Antártico (*Macronectes giganteus*)
- Petrel damero o moteado (*Daption capense*)
- Petrel de las nieves (*Pagodroma nivea*)
- Pingüino Macaroni (*Eudyptes chrysolophus*)
- Salteador pardo (*Stercorarius antarcticus*)
- Salteador polar (*Stercorarius maccormicki*)

Mamíferos

- Ballena jorobada (*Megaptera novaeangliae*)

- Elefante marino del Sur (*Mirounga leonina*)
- Foca de Weddell (*Leptonychotes weddellii*).
- Foca leopardo (*Hydrurga leptonyx*)
- Foca cangrejera (*Lobodon carcinophagus*)
- Lobo fino Antártico (*Arctocephalus gazella*)

Anexo 4: Países contratantes del Tratado Antártico. Vigente desde el 23 de junio de 1961.

Países signatarios:

- | | |
|---------------|------------------|
| ● Reino Unido | ● Francia |
| ● Sudáfrica | ● Nueva Zelandia |
| ● Bélgica | ● Rusia |
| ● Japón | ● Argentina |
| ● EE. UU. | ● Australia |
| ● Noruega | ● Chile |

Países adherentes:

- | | |
|----------------------|---------------------|
| ● Polonia | ● Grecia |
| ● República Checa | ● Corea del Norte |
| ● Eslovaquia | ● Austria |
| ● Dinamarca | ● Ecuador |
| ● Países Bajos | ● Canadá |
| ● Rumania | ● Colombia |
| ● Brasil | ● Suiza |
| ● Bulgaria | ● Guatemala |
| ● Alemania | ● Ucrania |
| ● Uruguay | ● Turquía |
| ● Papua Nueva Guinea | ● Venezuela |
| ● Italia | ● Estonia |
| ● Perú | ● Bielorrusia |
| ● España | ● Mónaco Principado |
| ● China | ● Portugal |
| ● India | ● Malasia |
| ● Hungría | ● Pakistán |
| ● Suecia | ● Kazajistán |
| ● Finlandia | ● Mongolia |
| ● Cuba | ● Islandia |
| ● Corea del Sur | |

Anexo 5: Certificados de bioseguridad y bioética

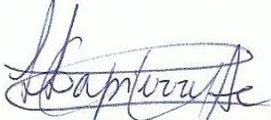


CERTIFICADO N° 113

Santiago, 6 abril, 2018

El Comité de Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, ha revisado el proyecto INACH 46-16, titulado "DETERMINACIÓN DE INFECCIÓN CONTRA Avian avulavirus 19 EN PINGÜINOS DEL TERRITORIO ANTÁRTICO CHILENO, DURANTE EL AÑO 2017", cuyo Investigador Responsable es el Dr. Víctor Neira M, académico de FAVET.

El proyecto cumple las normas de bioseguridad, las que se encuentran descritas en el mismo y en el formulario de solicitud de certificados de bioseguridad de FAVET, y que son las adecuadas según las especificaciones contenidas en el "Manual de Bioseguridad en el Laboratorio, de la Organización Mundial de la Salud (versión 2005)" y en el "Manual de Bioseguridad de Conicyt" (versión 2008), que previenen los riesgos para las personas, los animales y el medioambiente.


DRA. LISETTE LAPIÈRE A.
Coordinadora
Comité de Bioseguridad
FAVET





PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DE CHILE

COMITÉ ASESOR INSTITUCIONAL DE SEGURIDAD EN
INVESTIGACIÓN DE LA PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE
CHILE

INFORME DE EVALUACIÓN

Proyecto:

150430002

Ecología del virus de influenza aviar en la Antártica: el rol de las aves migratorias en la introducción del virus influenza en la población de pingüinos

Institución Responsable:

Pontificia Universidad Católica de Chile

Responsables UC:

1.- Investigador Responsable y Académico Responsable:

Rafael Medina

Profesor Asociado

Facultad de Medicina

Tipo de estudio:

Investigación

Documentos revisados y aprobados por el comité:

Ficha de presentación

Protocolo de Seguridad

Protocolo Anexo de Seguridad en Salidas a Terreno

Compromiso de los investigadores para ambos protocolos

Proyecto Completo

Certificado que indica el monto asignado para cubrir viajes, seguros durante la investigación

Certificado de Capacitación en Seguridad

Diagrama de flujo de desecho de residuos químicos y biológicos y normativa vigente.

Fundamentación de la aprobación:

1.- El protocolo contempla salidas a terreno para obtener muestras biológicas de origen animal con el objetivo de cuantificar la presencia del virus en 3 especies de pingüinos antárticos y en 5 especies de aves marinas migratorias.

- a) El traslado a Punta Arenas se realizara por vía aérea en una línea comercial, desde ahí se esperará que INACH indique se realizará el viaje al territorio antártico. En el caso que se deba esperar por más de un día en Punta Arenas los fondos adjudicados cuentan con
- b) Esta actividad será realizada en 3 ocasiones, una vez por año, cada una en un plazo de 20 días con flexibilidad por cambios climáticos.
- c) Dentro de las medidas de seguridad que se tomarán se encuentran:
 - En el terreno se contará con personal calificado que entregue una inducción de conductas a seguir en zonas extremas.
 - Se contratará un seguro que incluye la cobertura de emergencias en caso de evacuación.
 - Se adquirirá indumentaria personal térmica y de aislación, de acuerdo a las condiciones climáticas adicional a la entregada por INACH (buzos y parkas aislantes)
 - Todos los integrantes del equipo de terreno deberán obtener un certificado médico aprobado por la INACH antes de partir desde Santiago a Punta Arenas para participar en la expedición. Por tanto, cada miembro que participe se encontrara en óptimas condiciones de salud antes de comenzar la estadía en la Antártica.
 - En caso de emergencia se comunicará inmediatamente al personal de apoyo de INACH o de la FACH quienes están encargados de la asistencia a los investigadores y del traslado a Punta Arenas, en caso de que esto sea necesario por razones médicas.
 - Durante el procedimiento experimental con aves que potencialmente pueden portar virus de influenza aviar, u otros patógenos infecciosos de aves, se utilizarán siempre guantes y mascarillas como medida de precaución.

2.- El protocolo evaluado contempla el uso de químicos teratogénicos, inflamables y tóxicos como etanol, isopropanol, agarosa, buffer TAE, SYBR Safe, azul de tripán, paraformaldehído, y gases como CO₂. El trabajo con compuestos químicos se llevará a cabo en el Laboratorio de Virología Molecular del Centro de Investigaciones Médicas de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Este laboratorio cuenta con elementos de seguridad como campana de extracción, lava-ojos de emergencia y ducha de emergencia.

Para el trabajo con compuestos químicos peligrosos se contemplan medidas de seguridad necesarias como:

- a) Correcta rotulación de los reactivos químicos utilizados en la investigación, los cuales contarán con su ficha de seguridad, tendrán fecha de vencimiento vigente y no se almacenarán por más de 7 años.
- b) Para la manipulación de los compuestos químicos se utilizan como elementos de protección personal delantal, guantes, protección visual y calzado cerrado.

3.- El protocolo contempla el procesamiento de muestras biológicas de aves presentes en el territorio antártico, específicamente muestras de cloaca y tráquea para realizar diagnóstico, genotipificación, aislamiento viral y sangre para diagnóstico serológico. También se realizarán estudios con virus Influenza A aviar de baja patogenicidad de los subtipos H1, H4, H6, H8 y H16 aislados desde las muestras obtenidas en terreno.

- a) Las muestras serán colectadas en terreno como se describe anteriormente en este informe.
 - b) El procesamiento de las muestras se realizará en el Laboratorio de Virología Molecular del Centro de Investigaciones Médicas de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica. Este laboratorio cuenta con elementos de seguridad como acceso restringido, sala de toma de microorganismos, sala de cultivo, gabinete de bioseguridad, ducha de seguridad y autoclave.
 - c) Las muestras serán procesadas en un gabinete de bioseguridad disponible en sala de cultivo celular del laboratorio nivel 2 de bioseguridad, mientras que para realizar aislamientos de ciertas cepas virales se trabajará en el Laboratorio de Bioseguridad 3 del Centro de Investigaciones Médicas de la Facultad de Medicina de la Pontificia Universidad Católica de Chile.
- 4.- Los residuos producidos en esta investigación serán eliminados en un contenedor plástico con cloro, que se retirará diariamente, de acuerdo a la normativa establecidas para el Centro de Investigaciones Médicas

Resolución del Comité:

En sesión extraordinaria del Comité Asesor Institucional de Seguridad se ha determinado la **Aprobación** de este protocolo.

Esta aprobación tiene vigencia de 1 año a contar de la fecha de emisión del presente informe.

En la eventualidad de incorporar modificaciones a los procedimientos especificados en el protocolo aprobado, el investigador deberá notificarlo al comité para la emisión de una nueva carta de aprobación.

Los Responsables UC se comprometen a dar fiel cumplimiento al protocolo aprobado.

Le saluda atentamente,



Dra. ANDREA LEISEWITZ V. PhD

Presidente Comité Asesor Institucional de Seguridad en Investigación
Pontificia Universidad Católica de Chile.

Santiago, 09 de septiembre de 2015

Protocolos: 150430002



PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DE CHILE

ACTA DE APROBACIÓN ÉTICA DEL COMITÉ ÉTICO CIENTÍFICO EN CUIDADO DE ANIMALES
AMBIENTE Y SEGURIDAD DE LA INVESTIGACIÓN

Miembros del Comité Ético Científico

Dra. Gloria Valdés

Médico Cirujano. Presidenta CEC. Facultad de Medicina PUC.

Dr. Ricardo Moreno

Biólogo. Vicepresidente CEC. Profesor Asociado Facultad de Cs Biológicas. PUC

M.Sc. Ana María Salas Rossetti

Médico Veterinaria. Secretaria Ejecutiva CEC.

Dra. Susan Bueno

Tecnóloga Médica. Profesor Asociado. Facultad de Cs Biológicas. PUC.

Dra. Jessica Gimpel

Médico Veterinaria. Encargada Bioterio CIM

Dra. Dolores Busso

Bióloga. Profesor Asistente Facultad de Medicina

Dr. Waldo Cerpa

Bioquímico. Profesor Asistente. Facultad de Cs Biológicas. PUC.

M.Sc. Micaela Ricca

Encargada Bioterio. Facultad de Cs Biológicas. PUC.

Dr. Ricardo Borquez

Ingeniero Agrónomo. Académico. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. PUC.

Dr. José Luis Riveros

Médico Veterinario. Académico. Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal. PUC.

M.Sc. Gonzalo Chavez

Médico Veterinario. Miembro Externo.

Sr. Jorge Muñoz

Abogado

Dr. Juan Carlos Castilla

Biólogo Marino. Académico. Facultad de Cs Biológicas. PUC

Participaron en la Aprobación del Protocolo titulado: "Ecología del virus de influenza aviar en la Antártica: el rol de las aves migratorias en la introducción del virus influenza en la población de pingüinos"

Investigador y Académico Responsable: Rafael Medina Silva

Institución: Facultad de Medicina, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Número asignado CEC: 150430002

Financiamiento: XXI Concurso Nacional de Proyectos de Investigación Científica y Tecnológica Antártica.

Documentos revisados y aprobados por el comité:

Protocolo de Cuidado y Uso de Animales, compromiso del investigador, carta Gantt del proyecto de investigación, resumen del proyecto original, carta dirigida al comité ético científico, describiendo las competencias de cada uno de los integrantes del equipo de investigación, respuesta escrita a las observaciones de los revisores, informe de evaluación de seguridad del comité asesor institucional de seguridad en investigación PUC.

Fundamentación de la aprobación:

El protocolo presentado "Ecología del virus de influenza aviar en la Antártica: el rol de las aves migratorias en la introducción del virus influenza en la población de pingüinos", corresponde a un proyecto de investigación cuyo objetivo central es evaluar la hipótesis en la que aves migratorias actuarían como vectores transportando y contribuyendo a la infección de la avifauna de pingüinos en la Península Antártica con el virus de influenza aviar. Para evaluar esta posibilidad, los autores plantean cuantificar la presencia del virus en 3 especies de pingüinos antárticos y en 5 especies de aves marinas migratorias (gaviotas, petreles, piqueros). Para ello, los autores deberán obtener muestras de heces, sangre y secreciones de la tráquea de estas especies en terreno, las que luego serán examinadas para evaluar la presencia del virus a través

de técnicas de laboratorio estándar para este tipo de mediciones. Además, los autores planean secuenciar el virus, lo que les permitirá realizar inferencias sobre el origen evolutivo del virus presente en pingüinos antárticos.

El protocolo contempla la captura y posterior liberación de 1200 *Pygoscelis adeliae*, *Pygoscelis gentoo* y *Pygoscelis shinsstrap* (pollos, juveniles, adultos); 240 *Macronectes giganteus*, 240 *Chionis alba*, 240 *Larus dominicanus*, 240 *Sterna paradise*, 240 *Stercorarius maccormicki* (juveniles y adultos) lo que suma un total de 2400 animales en un periodo de tres años.

Este proyecto se basa en el estudio de influenza aviar en especies aviares silvestres autóctonas en la zona Antártica, el muestreo de las aves mencionadas es fundamental para contestar la hipótesis planteada, no existen modelos alternativos para el desarrollo de la presente investigación.

El número de animales a utilizar fue calculado en base a número mínimo de individuos que permita determinar la prevalencia del virus en las poblaciones a muestrear. Las especies fueron seleccionadas por su distribución en el territorio Antártico Chileno además de ser parte esencial para dar respuesta a la hipótesis planteada. La esencia del estudio hace inevitable muestrear aves migratorias y residentes de territorio Antártico. Es importante destacar, que las 3 especies seleccionadas no están en estado de peligro, lo que disminuiría el impacto ecológico del presente estudio.

En lo que respecta al uso de animales este protocolo cumple con los principios básicos planteados en el Código Sanitario de los Animales Terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal, la Directiva Europea 2010/63/UE y la Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio del Consejo Nacional de Investigación de los Estados Unidos (ILAR, NRC, 1996), documentos a los que adscribe esta institución. El protocolo cumple también con el principio de las 3Rs: Reemplazar, Reducir y Refinar.

Finalmente el Investigador y académico responsable, se compromete a dar fiel cumplimiento al protocolo aprobado y garantizar que este corresponde a la metodología presentada en el proyecto: *"Ecología del virus de influenza aviar en la Antártica: el rol de las aves migratorias en la introducción del virus influenza en la población de pingüinos"*

Resolución CEC en Cuidado y Uso de Animales y Seguridad de la Investigación:

Esta aprobación tiene vigencia de un año. En la eventualidad de incorporar modificaciones como por ejemplo, en el número de animales, el personal a cargo, los procedimientos especificados en el protocolo aprobado u otros, el investigador deberá notificar al comité para la evaluación y emisión de una nueva acta de aprobación ética.

Este proyecto ha sido aprobado con fecha 08 de Septiembre de 2015 en la XVIª Sesión del Comité Ético Científico para el Cuidado de Animales y Ambiente.

Lo saluda muy atentamente,



Gloria Valdés
Presidente del Comité Ético Científico para el
Cuidado de Animales y Ambiente.
PUC.
Santiago 09.09.2015

Anexo 6: Protocolo de preparación de BBS

Para preparar una solución de buffer Borato salino 1 M con un pH 9: En un matraz se agregan 18.55 gramos de ácido bórico y 2850 mL de H₂O. Luego se incorporan NaOH a 10M hasta obtener un pH 9 (se mide a través de un ph-metro), finalmente se añade H₂O hasta los 3.000 mL (Ausubel *et al.*, 1995).

Anexo 7: Multiplicación del virus

Para el desarrollo del diagnóstico serológico, se utilizó la prueba de inhibición de la hemaglutinación. Esta técnica requiere del virus problema (*Avian avulavirus 19*), para lo cual éste debe ser multiplicado previo a la realización de esta prueba. Para multiplicar el virus, se utilizaron huevos embrionados de pollo libre de patógenos de 10 días de incubación. Brevemente, la cámara de aire de los huevos se demarca, indicando el punto de inoculación. Posteriormente, cada huevo fue inoculado con 200 µL de líquido alantoideo con infección viral, usando una jeringa de tuberculina. Luego el huevo se selló e incubó a 37°C por 3 días. Para la obtención de una concentración adecuada de virus se inocularon 10 huevos. Posteriormente, los huevos embrionados fueron eutanasiados utilizando una cámara de CO₂ y luego refrigerados por 6 horas antes de ser cosechados. En el momento de cosecha, el líquido alantoideo obtenido de los huevos embrionados fue titulado usando la técnica de hemaglutinación y conservados en alícuotas para su posterior uso (Del Río, 2017).