



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

**DETECCIÓN DE ANTICUERPOS SÉRICOS CONTRA *Avian  
avulavirus 17 y 18* EN POBLACIONES DE PINGÜINOS DE LAS ISLAS  
SHETLAND DEL SUR, ANTÁRTICA**

**Vanina Verónica Muñoz Sepúlveda**

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, Fondecyt 11170877

SANTIAGO, CHILE

2021



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

**DETECCIÓN DE ANTICUERPOS SÉRICOS CONTRA *Avian  
avulavirus 17 y 18* EN POBLACIONES DE PINGÜINOS DE LAS ISLAS  
SHETLAND DEL SUR, ANTÁRTICA**

**Vanina Verónica Muñoz Sepúlveda**

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

Nota final:.....:

Firma

Profesor Guía      Víctor Neira Ramírez      :.....:  
Profesor Corrector    José Pizarro Lucero      :.....:  
Profesor Corrector    Cristóbal Briceño Urzúa      :.....:

Financiamiento Proyecto INACH 46-16, Laboratorio de Virología Animal, Fondecyt 11170877

SANTIAGO, CHILE

2021

## **AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIA**

Agradezco a

Dr. Víctor Neira Ramírez mi profesor guía, a mis compañeros de laboratorio Juan Mena, Rodrigo Tapia, Nina Oñate, Fernanda Meza, Camilo Gálvez, Felipe Berríos, Valentina Valdés y Vicente Meneses, quienes me ayudaron y me enseñaron durante mi trabajo en el laboratorio, gracias por su buena voluntad y simpatía.

A mis hermanos, a Magda, Francisco y Salva, mis primos, a mis amigos y personas

quienes me ayudaron en la vida,

de todos pude aprender,

pero en especial a

Verónica Sepúlveda y Esteban Muñoz mis padres,

a quienes dedico esta memoria de título,

me dieron todo lo que tengo en la vida,

los amo

gracias, Dios, por esta vida con ellos.

## ÍNDICE DE CAPÍTULOS

<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	ii
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	ii
<b>RESUMEN</b> .....	iii
<b>ABSTRACT</b> .....	IV
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	2
Etiología y características virales .....	2
Identificación de AVv17, AVv18 y otros paramyxovirus aviars.....	2
Antecedentes de las especies de pingüinos antárticos .....	3
Otros virus detectados en pingüinos .....	4
Islas Shetland del Sur.....	4
Justificación del estudio.....	5
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	6
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	6
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	7
Diseño .....	7
Obtención de muestras.....	7
Procesamiento de la muestra.....	8
Titulación viral.....	9
Técnica de inhibición de la hemaglutinación (HI).....	9
Análisis de resultados .....	10
<b>RESULTADOS</b> .....	11
<b>DISCUSIÓN</b> .....	14

<b>CONCLUSIÓN</b> .....	17
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	18
<b>ANEXOS</b> .....	23
1: Descripción de sitios muestreados.....	23
2: Principales medidas de bioseguridad en laboratorios nivel 2.....	24
3: Certificado de Bioseguridad .....	26
4: Certificado de Bioética .....	27

## **ÍNDICE DE TABLAS**

Tabla Nro. 1: Zonas en que se tomaron muestras y cantidades de sueros que serán analizados en este estudio.....	7
Tabla Nro. 2: Número de pingüinos muestreados, según especie y localidad.....	12

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura Nro. 1: Ubicación de las Islas Shetland del Sur dentro del Continente Antártico.....	8
Figura Nro. 2: Prueba de hemaglutinación en placa con fondo de “v”.....	9
Figura Nro. 3: Gráfico de resultados HI totales para AVv17 .....	11
Figura Nro. 4: Gráfico de resultados HI totales para AVv18 .....	12
Figura Nro. 5: Mapa de las zonas muestreadas con resultados destacados.....	13

## RESUMEN

Las especies *Avian avulavirus 17* y *18* (AVv17 y AVv18, respectivamente) son dos virus que se descubrieron y aislaron desde pingüinos Papúa en la Isla Kopaitic, Antártica el año 2017. Estos virus, pertenecen al género *Avulavirus*, familia *Paramyxoviridae*, orden *Mononegavirales* y a la fecha se desconoce su distribución en la península Antártica. El objetivo de esta memoria es la detección de anticuerpos séricos contra AVv17 y AVv18, en las tres especies descritas de pingüinos *Pygoscelis spp*, utilizando la prueba de inhibición de la hemaglutinación (HI). En el año 2018 se obtuvo muestras de suero de pingüinos desde 6 zonas de las Islas Shetland del Sur, Antártica: Grupa de León, Isla Ardley, Punta Armonía, Isla Barrientos, Punta Hanna y Cabo Wallace, incluyendo pingüino de Adelia (*Pygoscelis adeliae*), Barbijo (*Pygoscelis antarcticus*) y Papúa (*Pygoscelis papua*). De un total de 360 muestras de sueros obtenidas, sólo 3 (0,83%) de ellas fueron positivas para el AVv17 y ninguna para el AVv18 (0%). Los sueros positivos correspondían a pingüinos Papúa, muestreados en Isla Ardley y Grupa de León. Numerosos estudios revelan la multifactoriedad que afecta a la ecología, propagación de enfermedades, etc., de estas y otras aves, y por lo tanto la necesidad de seguir los estudios y comprender qué está sucediendo en estas aves en este ambiente prístino. En conclusión, la hipótesis resultó ser rechazada ya que, en solo uno de los virus hubo seropositividad y en solo una de las especies de pingüinos en estudio.

Palabras clave: *Avian avulavirus 17*, *Avian avulavirus 18*, Antártica, pingüinos *Pygoscelis*

## **ABSTRACT**

The *Avian avulaviruses 17 and 18* (AVv17 and AVv18, respectively) are two novel viruses recently discovered and isolated from Gentoo penguins at Kopaitic Island, Antarctica in 2017. These viruses belong to the genus *Avulavirus*, family *Paramyxoviridae*, order *Mononegavirales* and its distribution at the Antarctic peninsula is unclear. The objective of this study is the detection of serum antibodies against AVv17 and AVv18, in the three described *Pygoscelis spp* penguin species, using the hemagglutination inhibition test (HI). Samples were obtained in 2018 in 6 areas of the South Shetland Islands, Antarctica: Lion's Rump, Ardley Island, Harmony Point, Barrientos Island, Hanna Point and Cape Wallace. The penguins in this study are Adelia (*Pygoscelis adeliae*), Chinstrap (*Pygoscelis antarcticus*) and Gentoo (*Pygoscelis papua*). Three (0.83%) out of 360 total serum samples were positive for AVv17 and none (0%) for AVv18. The positive sera came from Gentoo penguins, located on Ardley Island and Lion's Rump. Several studies reveal the multiple factors that can affect the ecology, and the disease spread in penguin and other Antarctic birds; therefore, further studies are needed to better understand the viral dynamics in penguins in this pristine environment. In conclusion, the hypothesis is rejected, since in only one of the viruses there was seropositivity and in only one of the penguin species under study.

**Key words:** *Avian avulavirus 17*, *Avian avulavirus 18*, Antarctic, *Pygoscelis* penguins.

## INTRODUCCIÓN

La Antártica es un continente prístino, reservado para la ciencia y paz de la humanidad (STA, 2019). Dentro de la fauna más reconocible en Antártica se encuentran los pingüinos, quienes han sido estudiados en diferentes aspectos durante décadas. En uno de los más recientes estudios en pingüinos, se descubrieron tres nuevas especies de paramyxovirus en pingüinos Papúa (*Pygoscelis papua*) en la Isla Kopaitic, Antártica; los que fueron denominados Antarctic penguin virus A, B y C. Se comprobó que estos virus no tenían antigenicidad cruzada mediante ensayos serológicos y análisis genéticos y que, por ende, serían especies distintas, designándose como *Avian avulavirus 17, 18 y 19*, respectivamente (Kuhn *et al.*, 2017; Neira *et al.*, 2017; ICTV, 2018). Hasta la fecha, existen 19 *Avian avulavirus* descubiertos. De ellos, el virus de la enfermedad de Newcastle (*Avian avulavirus 1*) es el más importante, debido a que infecta aves de todo el mundo, generando grandes pérdidas socioeconómicas a la industria avícola. A pesar de esto, poco se sabe acerca de su ecología en aves silvestres, que son reservorios importantes de cepas lentogénicas, y, menos aún, sobre la ecología de los otros dieciocho avulavirus aviáres en aves silvestres (Wille *et al.*, 2019). Para los tres nuevos paramyxovirus descubiertos por Neira *et al.* (2017), se ha encontrado evidencia serológica en pingüinos infectados (Olivares *et al.*, 2019), pero aún no se sabe el impacto total que éstos avulavirus tengan en el ámbito de conservación de estas y otras aves o especies blanco (Olivares, 2018). El estudio interdisciplinario de enfermedades presentes en la fauna silvestre contribuye no solo a su salud y conservación, sino también a la salud pública, ya que muchas enfermedades son zoonóticas (Nara *et al.*, 2008). Comprendiendo esto, se hace necesario realizar más estudios, conocer qué ocurre en estos animales silvestres respecto de estos nuevos virus descubiertos en este particular ambiente.

En la presente memoria de título se propone la detección de anticuerpos séricos contra *Avian avulavirus 17 y 18* (AVv17 y AVv18, respectivamente), en tres poblaciones de pingüinos pygoscelídeos: Adelia (*Pygoscelis adeliae*), Barbijo (*Pygoscelis antarcticus*) y Papúa (*Pygoscelis papua*), muestreados el año 2018 en seis zonas de las Islas Shetland del Sur, Antártica.



## **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **Etiología y características virales**

Las especies AVv17 y AVv18 son dos de los virus que han sido recientemente descubiertos en pingüinos del género *Pygoscelis* en la Antártica por Neira *et al.* (2017), nombrados Virus del Pingüino Antártico A y B respectivamente. Estos virus pertenecen al género *Avulavirus*, familia *Paramyxoviridae*, orden *Mononegavirales*. Ambos se caracterizan por ser un virus envuelto, con proteínas de superficie y su genoma está contenido en una molécula monocatenaria de ARN de sentido negativo, no segmentada, que varía entre 14.926 y 15.071 nucleótidos. Contienen seis genes que codifican para: nucleoproteína (NP), fosfoproteína (P), proteína matriz (M), proteína de fusión (F), proteína hemaglutinina-neuroaminidasa (HN) y la proteína ARN polimerasa dependiente de ARN (Neira *et al.*, 2017; ICTV, 2018). Estos virus fueron aislados por primera vez en la Isla Kopaitic, en el Noroeste de la península Antártica, y más tarde descritos también en la Isla Rey Jorge, perteneciente a las Islas Shetland de Sur (Wille *et al.*, 2019). Al parecer, estos virus son de baja patogenicidad, pues al ser inoculados en aves de corral, no produjeron signos clínicos, sin embargo, no se sabe de su comportamiento en pingüinos ni otras aves de vida libre (Wille *et al.*, 2019).

### **Identificación de AVv17, AVv18 y otros paramyxovirus aviare**

Como herramientas de diagnóstico de AVv17 y AVv18, se han utilizado diagnósticos directos e indirectos. En un comienzo, los virus se diagnosticaron mediante aislamiento viral, y luego se detectaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) genérica para la familia paramyxovirus (Neira *et al.*, 2017). Hoy en día, se ha desarrollado una técnica de PCR en tiempo real para la detección específica del AVv17 y AVv18 (Wille *et al.*, 2019). Por otra parte, la OIE (2012) recomendó el aislamiento viral en huevo embrionado para la obtención y diagnóstico de los paramyxovirus aviare. En cuanto a la serología, la única técnica usada a la fecha es la prueba de inhibición de la hemaglutinación (HI). La prueba HI puede tener cierto nivel de reactividad cruzada (OIE, 2012), sin embargo, ni el AVv17 ni AVv18 mostraron reactividad cruzada contra otros *Avian avulavirus*. A la fecha, usando HI se han detectado escasos anticuerpos contra AVv17 y AVv18 en pingüinos Barbijo y Papúa ubicados en el Cabo Shirreff, Isla Livingston e Islas

Shetland del Sur, aunque podrían estar presentes en otras regiones (Neira *et al.*, 2017; Olivares *et al.*, 2019).

La prueba de HI es de carácter cuantitativo, ya que permite detectar y estimar la cantidad (titulación) de anticuerpos específicos contra un determinado virus con actividad hemaglutinante, en suero, plasma o yema de huevo. Para los paramyxovirus aviáres, la hemaglutinación es dada por la unión entre la proteína HN y 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 (Spackman, 2014).

### **Antecedentes de las especies de pingüinos antárticos**

Los pingüinos estudiados corresponden al género *Pygoscelis*, los cuales habitan el litoral antártico, con algunas variaciones (Couve *et al.*, 2016). A continuación, se describe brevemente cada una de las especies estudiadas.

**Adelia (*Pygoscelis adeliae*):** es el más pequeño de los pingüinos antárticos (71 cm de largo), de cabeza, iris, dorso y cola negros, con notorio círculo periocular blanco, pico corto y rojizo, pecho y abdomen blanco y patas rosadas. Nidifica en playas rocosas, libres de hielo, en grandes colonias (Couve *et al.*, 2016).

**Barbijo (*Pygoscelis antarcticus*):** mide 76 cm de largo, su frente, corona y partes posteriores son negras y las partes anteriores blancas. En su cara, también blanca, destaca una línea fina negra similar a una barba. Tiene pico negro, iris café-rojizo y patas rosadas. Nidifica en zonas más altas que otros pingüinos, en costas rocosas libres de hielo, en grandes colonias (Couve *et al.*, 2016).

**Papúa (*Pygoscelis papua*):** De 76-90 cm de largo, cabeza, cuello y parte posterior negra, parte anterior blanca, manchas blancas sobre cada ojo, que se unen por sobre la corona, a manera de “cintillo”. Tiene pico negro y laterales rojo- anaranjado y patas rosadas. Para nidificar prefiere playas pedregosas y laderas rocosas libres de hielo, en colonias pequeñas y dispersas (Couve *et al.*, 2016).

## Otros virus detectados en pingüinos

El inicio de la investigación de virus antárticos (década de 1970) fue mediante serología, detectando principalmente patógenos que representaban un riesgo para la salud animal. Desde el año 2000, se utilizan otras técnicas como PCR, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), cribado de alto rendimiento (HTS), amplificación rápida de los extremos del ADNc (RACE) y reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) (Smeele *et al.*, 2018), detectándose a la fecha:

***Paramyxoviridae***: *Paramyxovirus Aviar* en Pingüinos Adelia, Macaroni y Rey (Morgan y Westbury, 1981; Austin y Webster, 1993; Morgan *et al.*, 1981). Virus de la enfermedad de Newcastle en pingüinos Adelia, *Avian avulavirus 10* en pingüinos de Penacho amarillo y *Avian avulavirus 17, 18 y 19* en pingüinos *Pygoscelis* (Thomazelli *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2010; Goraichuk *et al.*, 2017; Neira *et al.*, 2017), siendo los paramyxovirus aviares 17 y 18 los abordados en este trabajo.

***Ortomyxoviridae***: Virus de la Influenza A en Pingüinos Adelia, Barbijo y Papúa (Morgan *et al.*, 1981; Austin y Webster, 1993; Baumeister *et al.*, 2004). Virus de la Influenza aviar H5N5 en pingüino Barbijo (Hurt *et al.*, 2016) y H11N2 en pingüino Adelia (Hurt *et al.*, 2014).

Otros virus incluyen, familia *Birnaviridae*: Virus Gumboro en Pingüinos Adelia, Emperador y Rey; familia *Papilomaviridae*: Papilomavirus 1 y 2 en pingüino Adelia (Van Doorslaer *et al.*, 2017); familia *Polyomaviridae*: Polyomavirus del pingüino Adelia y familia *Adenoviridae*: Adenovirus del pingüino Barbijo y Adenovirus del pingüino Papúa (Lee *et al.*, 2014 y 2016).

## Islas Shetland del Sur

Las Islas Shetland del Sur integran a un grupo de islas ubicadas 160 km al Noroeste de la península Antártica y aproximadamente a unos 725 km al Sureste del Cabo de Hornos, cruzando el mar de Drake y se extienden unos 550 km de largo (Figura Nro. 1). Gran parte de estas islas se encuentran cubiertas por hielo, excepto ciertas penínsulas y promontorios; de ellas, las más extensas son Isla Rey Jorge e Isla Livingston (Israel, 2015).

Este archipiélago ha sido una de las áreas de la Antártica más explorada debido a la cercanía que tiene con el continente americano, en ella se encuentran 17 bases científicas, pertenecientes a 13 naciones de América, Europa y Asia.

Gran parte de estas islas o lugares específicos dentro de estas, han sido catalogadas como zonas antárticas especialmente protegidas (ZAEP), a fin de proteger investigaciones científicas, valores estéticos, históricos o naturales sobresalientes. Uno de esos puntos es conservar la avifauna nativa que se reproduce en estas islas, detectar y registrar cambios significativos de su ecología y compararlas con otras áreas (STA, 2011). Algunas zonas destacables incluidas en esta memoria se describen en el **anexo 1**.

### **Justificación del estudio**

Numerosos estudios científicos recientes y pasados relatan la necesidad de estudiar a fondo estos y otros tipos de virus, de manera que puedan revelar puntos importantes que estén transgrediendo su ecología. Thomazelli *et al.* (2010) habla de la implicación de otras especies en la transmisión del virus de Newcastle (*Avian avulavirus 1*). De esta forma, la velocidad del transporte moderno a la Antártica y el aumento de personas que visitan las regiones del polo sur puede aumentar la posibilidad de introducción involuntaria de enfermedades. Además, el cambio climático puede facilitar la propagación de enfermedades a través de hábitos migratorios alterados de los animales y las aves y la introducción de vectores. Por otro lado, Neira *et al.* (2017) sugiere que, en la Antártica existe una diversidad de especies de virus pertenecientes al género avulavirus, mucho mayor que la reconocida anteriormente. Por lo tanto, se necesitan estudios adicionales para evaluar la presencia de estos nuevos virus en otras aves en la Antártica para comprender mejor la ecología y la transmisión de estos. Debido a lo anterior, en esta memoria de título se propone, mediante un estudio serológico, determinar la exposición a estos agentes virales en las poblaciones de pingüinos en la Antártica.

## **HIPÓTESIS**

Pingüinos del género *Pygoscelis* de las 6 localidades muestreadas de las islas Shetland del Sur presentarán anticuerpos contra *Avian avulavirus 17 y 18*.

## **OBJETIVO GENERAL**

Detectar anticuerpos contra *Avian avulavirus 17 y 18* en 6 poblaciones de pingüinos *Pygoscelis* de las Islas Shetland del sur.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Determinar la presencia de anticuerpos séricos contra *Avian avulavirus 17 y 18* en pingüinos Adelia (*Pygoscelis adeliae*), Barbijo (*Pygoscelis antarcticus*) y Papúa (*Pygoscelis papua*).
2. Determinar diferencias estadísticas entre zonas de muestreo, utilizando el título de anticuerpos como variable respuesta.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Diseño

Este estudio consistirá en usar un total de 360 muestras de suero obtenidas de pingüinos desde 6 localidades de las Islas Shetland del Sur, Antártica. Estos sueros serán evaluados en el laboratorio de Virología, Departamento de Medicina Preventiva, FAVET (nivel de bioseguridad 2, ver **anexos 2 y 3**), mediante la técnica de inhibición de la hemaglutinación, usando los virus de referencia para AVv17 y AVv18. Esto permitirá determinar la presencia de anticuerpos contra estos virus en los pingüinos.

### Obtención de muestras

Esta memoria de título se desarrolla dentro del marco del proyecto de investigación INACH RT 46-16, código de bioética (PUC-150430002) **anexo 4**, del cual el Dr. Neira es coinvestigador. Específicamente, las muestras fueron obtenidas en la expedición científica antártica 54 (ECA54), realizada por el Instituto Antártico Chileno, durante el mes de enero y febrero del año 2018. Se obtuvieron muestras sanguíneas de pingüinos *Pygoscelis* (puncionando la vena digital plantar común), para la obtención de sueros (conservados en congelación a -20°C). Las muestras fueron usadas para múltiples estudios y una alícuota de cada uno será utilizada para el presente trabajo. El muestreo realizado contempló la obtención de muestras de seis localidades ubicadas dentro de las Islas Shetland del Sur. En la Figura y Tabla Nro. 1 se presentan las 6 localidades (antárticas) en las que se realizó el muestreo.

Tabla Nro. 1: Zonas en que se tomaron muestras y cantidades de sueros que serán analizados en este estudio.

Zona	N° de sueros
Grupa de León	40
Isla Ardley	183
Punta Armonía	29
Isla Barrientos	34
Punta Hanna	41
Cabo Wallace	33
Total	360

## Procesamiento de la muestra

Las muestras sanguíneas serán centrifugadas a 1.250 g para obtener sus sueros. Luego, se procederá a inactivar los sueros para eliminar inhibidores naturales no específicos de la hemaglutinación. Brevemente, 100  $\mu$ L de cada suero es depositado en un tubo de ensayo de 5 mL por separado y puesto a baño María a 56°C. Pasados 30 minutos se agregarán 600  $\mu$ L de caolín (silicato de aluminio hidratado) al 25% en solución salina de borato (BBS) pH 9,0, agitando para que se mezclen y se deja incubar por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, se centrifugarán a 1.250 g por 20 minutos para que precipite el caolín. Cada sobrenadante se pondrá en tubos Eppendorf, se mezclará con 600  $\mu$ L de eritrocitos de pavo diluidos al 20% en buffer fosfato salino (PBS) y se dejará incubar 2 horas a temperatura ambiente. Se centrifugan a 1.250 g por 20 minutos, precipitando así los eritrocitos. Estos sueros serán diluidos en proporción 1:10, siguiendo el protocolo de Direksin *et al.*, 2002.

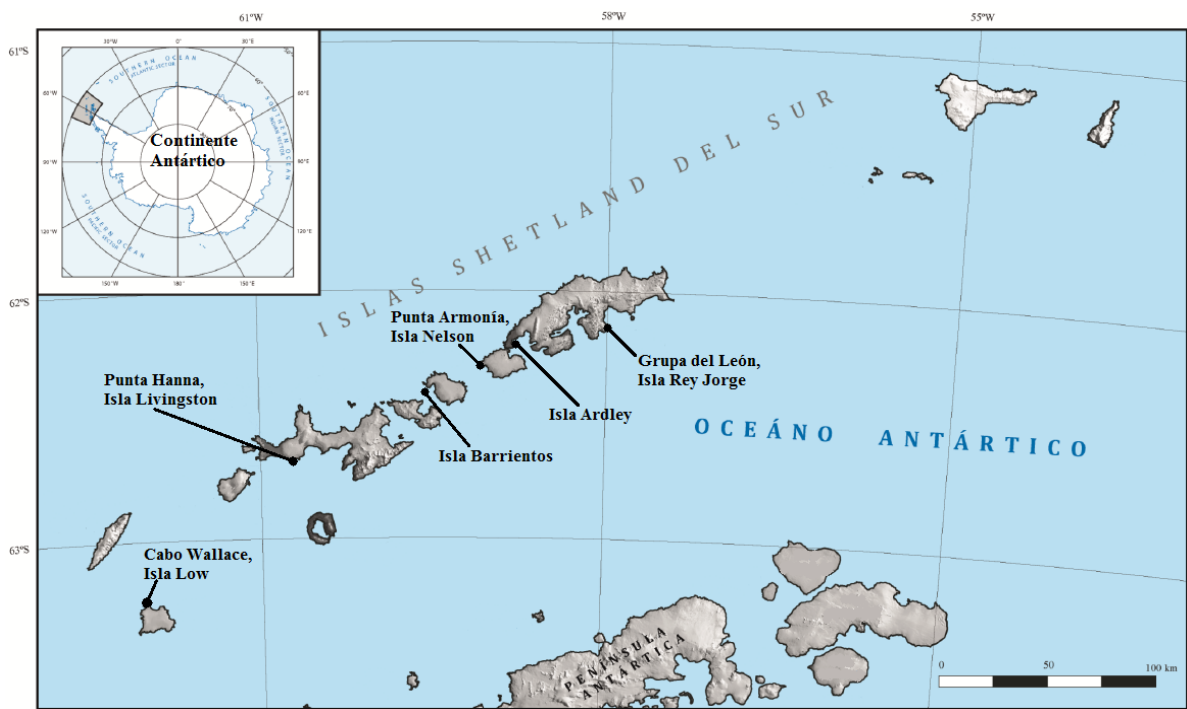


Figura Nro. 1: Ubicación de las Islas Shetland del Sur dentro del Continente Antártico marcadas en gris. Las localidades seleccionadas para toma de muestras a pingüinos *Pygoscelis* marcadas con puntos negros. Modificado de Israel, 2015.

## Titulación viral

Los virus utilizados fueron previamente aislados y secuenciados en el laboratorio de virología animal por Neira *et al.* (2017). Para realizar la prueba de inhibición de la hemaglutinación, primero se debe contar con ambos virus titulados. Por lo tanto, se procederá a realizar la prueba de hemaglutinación (HA), la cual se basa en utilizar la actividad hemaglutinante de los virus contenida en la proteína hemaglutinina-neuroaminidasa (HN). Para ello, se utilizarán placas de 96 pocillos con fondo en “v”. Brevemente, se depositarán 50  $\mu$ L de PBS en cada pocillo, luego en el primer pocillo de cada columna se agregarán 50  $\mu$ L de virus descongelado y homogenizado previamente por 5 segundos. Luego se diluirá en base dos, avanzando en la fila hasta el último pocillo. Posteriormente, se incorporan 50  $\mu$ L de eritrocitos de pavo diluido con PBS al 0,5%, partiendo desde el último pocillo diluido al primero. Se dejarán reposar 45 minutos y se observarán los resultados, siendo los pocillos con rojo difuso positivos y los con punto rojo en el fondo y que escurran al inclinar la placa, negativos (Figura Nro. 2). El título del virus es expresado en unidades hemaglutinantes cada 50  $\mu$ L (UHA/50  $\mu$ L) y es el recíproco de la última dilución en la cual se observa hemaglutinación (Knipe y Howley, 2013). Cada ensayo contempla el uso de controles negativos y es realizada en duplicado.

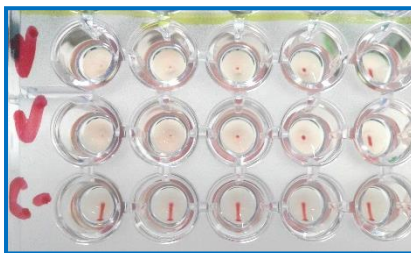


Figura Nro. 2: Prueba de hemaglutinación en placa con fondo de “v”, se observa un título de 16 UHA/50  $\mu$ L.

## Técnica de inhibición de la hemaglutinación (HI)

Para saber el título de anticuerpos contra cada virus, se usará la técnica de inhibición de la hemaglutinación. Brevemente, en una placa de 96 pocillos con fondo de “v”, se depositarán 25  $\mu$ L de PBS en cada pocillo, y luego se agregará 25  $\mu$ L de suero inactivado. Posteriormente se diluirá en base 2. Luego, se agregará 25  $\mu$ L de virus en una



concentración de 8 UHA a todos los pocillos en uso y se incubará 45 minutos a temperatura ambiente. De esta manera, los anticuerpos específicos se unirán al antígeno del virus. Finalmente, se agregarán 50  $\mu$ L de eritrocitos de pavo diluidos al 0,5% en PBS. Este paso permitirá identificar si hay virus libre de la unión con anticuerpos (los anticuerpos específicos bloquean la unión del virus al glóbulo rojo, por ende, bloquearían la hemaglutinación). La lectura de resultados en la placa se observará como un punto rojo precipitado que escurre al inclinar la placa (positivo) o como rojo difuso (negativo). El título del suero se evidenciará como el recíproco de la mayor dilución que produzca una completa inhibición de la hemaglutinación (Spackman, 2014). Se indicarán como positivos los sueros en los cuales se obtengan títulos  $\geq 40$  UHA/50  $\mu$ L.

### **Análisis de resultados**

El principal resultado del análisis sérico es el título de anticuerpos de las muestras de suero estimado a partir del ensayo de HI. Dichos títulos serán descritos por zona geográfica y por especie mediante tablas y gráficos, así como también, el porcentaje de animales con resultados serológicos positivos para cada virus. Se proyecta la prueba de chi cuadrado para investigar la significancia estadística del porcentaje de animales con sueros positivos o negativos entre lugares de muestreo. Para investigar diferencias significativas en el título de anticuerpos en las zonas de muestreo, se plantea la prueba no paramétrica de Kruskal Wallis. Finalmente, los resultados serán comparados con los obtenidos en años previos (Olivares, 2018; Olivares *et al.*, 2019; Wille *et al.*, 2019).



### Resultados totales AVv18

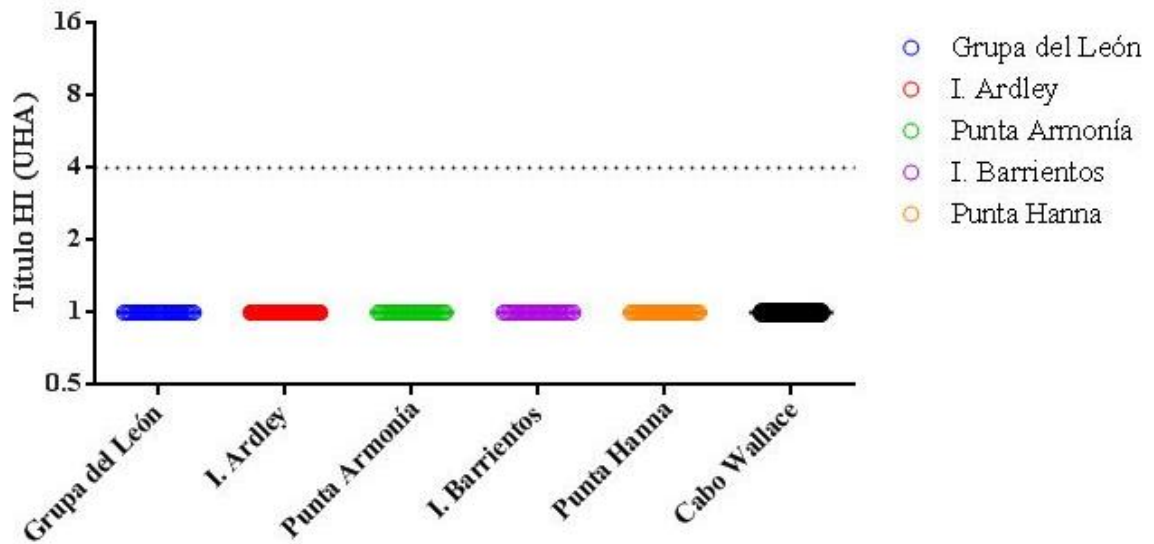


Figura Nro. 4: Resultados del ensayo de inhibición de hemaglutinación (HI) por localidad. No se detectaron títulos positivos ( $HI \geq 4$  UHA) en las localidades muestreadas para el AVv18. En círculos de colores se presentan los títulos de HI de las 360 muestras clasificadas por localidad.

Tabla Nro. 2: Número de pingüinos muestreados, según especie y localidad.

Zona	N° de Pingüinos		
	Adelia	Barbijo	Papúa
Grupa de León	0	3	37
Isla Ardley	50	13	120
Punta Armonía	0	28	1
Isla Barrientos	0	15	19
Punta Hanna	0	22	19
Cabo Wallace	0	33	0
Total	50	114	196



Figura Nro. 5: Distribución geográfica de especies y sus resultados. Solo se obtuvo resultados positivos para AVv17 y estos fueron encontrados en Grupa de León e Isla Ardley mediando una distancia de 42 km entre ambas zonas. En cada localidad se presentan las especies de pingüinos muestreadas y en un círculo anaranjado aquellas en que se detectó seropositividad para AVv17. Ninguna localidad presentó seropositividad para AVv18. Isla Ardley corresponde en realidad a un islote conectado con la Isla Rey Jorge, donde también se ubica Grupa de León.

Debido a la baja detección de sueros positivos no fue posible realizar análisis estadísticos que determinaran significancia entre los grupos. Por lo tanto, las pruebas exploratorias de Chi cuadrado para ver diferencias entre especie viral, especie de pingüino, entre otras, no son significativas.

## DISCUSIÓN

El ensayo de inhibición de la hemaglutinación (HI) permitió detectar la presencia de anticuerpos séricos, cumpliendo así con el primer objetivo específico de esta memoria. El hallazgo de seropositividad fue particularmente bajo para AVv17 (0,83%) y nulo para AVv18 (0%) con lo que no se proyecta la existencia de diferencias estadísticas entre los lugares de muestreo, respondiendo al segundo objetivo específico de la presente memoria. Sería interesante complementar estos hallazgos con muestras de pingüinos de otras localidades, muestras en meses de invierno o en otras especies de pingüinos.

Otros estudios ya habían evidenciado la presencia de estos virus en pingüinos antárticos. El primero corresponde a Neira *et al.*, 2017, quien los describe en pingüinos Papúa en isla Kopaitic a 200 km del lugar más cercano de muestreo del presente trabajo. Luego, Olivares, 2018, y Olivares *et al.*, 2019, describen la presencia de anticuerpos contra estos virus desde muestras obtenidas en 2017. Finalmente, Wille *et al.*, 2019, logró identificar estos virus en diversas partes de la península Antártica. Todos estos antecedentes demuestran la ubicuidad de estos virus en pingüinos antárticos, sin embargo, la ocurrencia de estos no ha sido la misma en los diferentes estudios, esto será discutido a continuación.

El escaso hallazgo de pingüinos seropositivos en isla Ardley concuerda con lo registrado por Olivares *et al.*, 2019, donde se obtuvo solo 1 (0,78%) suero positivo para AVv17 y ninguno para AVv18 (0%) del total muestreado en esa isla, esto se describirá en detalle.

En el estudio de Olivares *et al.*, 2019 se investigaron datos similares al de esta memoria, pero con muestras de pingüinos *Pygoscelis* del año 2017. En esa ocasión se recolectaron 498 muestras de suero (138 muestras más que en el actual estudio) desde distintas localidades a las del año 2018, excepto por Isla Ardley. En ese estudio, el AVv18 obtuvo la menor seroprevalencia (4%), mientras que el AVv17 obtuvo una seroprevalencia mayor (8%). Se detectó seropositividad en las tres especies de pingüinos *Pygoscelis* para ambos virus. En la única zona en común al estudio actual, Isla Ardley, se tomaron 128 muestras de suero de pingüinos Papúa, que para el AVv17 hubo solo un suero positivo (1%), mientras que para el AVv18 no hubo resultados positivos (0%), la mayoría de los pingüinos eran juveniles, previos a su primer forrajeo en el mar, esto pudo haber afectado los resultados en esa isla dada su corta edad y la menor probabilidad de encuentro con patógenos, pero, en el

estudio actual también existió una baja seroprevalencia, a pesar de ser individuos adultos. Esto puede deberse a que, como todos los anticuerpos duran poco tiempo, los individuos muestreados ya hayan pasado por la infección y/o los virus se presenten por “oleadas”, donde justamente en el momento de muestreo la infección no esté activa o los anticuerpos ya no existan o por el contrario esté recién empezando un nuevo brote. Aún no se sabe cuánto tiempo dura la inmunidad frente a estos virus en estas especies.

Isla Ardley representa a más del 50% del total de muestras de sueros obtenidas el año 2018 (tabla Nro. 2), de ellas, los pingüinos Papúa representan el 66%, de los que se obtuvo dos de los tres sueros positivos detectados.

Por otro lado, Wille *et al.*, 2019 aisló y secuenció los virus descubiertos por Neira *et al.*, 2017. Su estudio abarcó muestras de 301 pingüinos Adelia, obtenidos en zonas de las Islas Shetland del Sur (Bahía Admiralty, Isla Rey Jorge) y la Península Antártica (Isla Kopaitic, Rada Covadonga) y 74 pingüinos Papúa y 18 pingüinos Barbijo de la Isla Kopaitic. En ese estudio, el AVv17 fue el más prevalente (6%) detectado solo en pingüinos Adelia, de ambas localidades, sobre todo en polluelos, mientras que, el AVv18 se mantuvo como el menos prevalente (0.7%). Cabe destacar que estuvo presente solo en polluelos de pingüinos Adelia en la localidad de Bahía Admiralty. Estos resultados son similares a los obtenidos en Olivares *et al.*, 2019, siendo el AVv18 el que obtuvo menos seroprevalencia en ambos casos y el AVv17 obtuvo más seroprevalencia en ambos casos, pero con diferencias respecto de un tercer virus que no se incluye en esta memoria.

Otra zona por destacar del estudio de Olivares *et al.*, 2019 es Cabo Shirreff en Isla LIVINGSTON, perteneciente también a las Islas Shetland del Sur, donde se obtuvo 252 muestras de sueros de pingüinos Barbijo (en su mayoría) y Papúa. Fue la zona con más porcentaje de seropositividad en esa ocasión y, la única en que el AVv18 registró seropositividad, de todas las zonas muestreadas de ese estudio, llegando a un 8%, mientras que el AVv17 registró un 15% de seropositividad. Estas variaciones son interesantes debido a que podría estar implicado el desplazamiento de las aves, tanto por la diseminación y reservorios que pueden existir, como la edad en que es principalmente en donde se ven afectados los pingüinos, entre otras cosas. Mura-Jornet *et al.*, 2018 expone que, aunque las tres especies de pingüinos *Pygoscelis* muestran cierto grado de filopatría natal, los

pingüinos Barbijo son los menos filopátricos del género, asimismo, tienen altas tasas de dispersión y/o movilidad entre colonias Barbijo, en comparación a otras especies de *Pygoscelis*. En el estudio de Pertierra *et al.*, 2020 y posteriormente en Tyler *et al.*, 2020 se menciona que existen cuatro nuevos linajes del pingüino Papúa, los cuales se han podido desarrollar en parte, debido a su filopatría natal.

En cuanto al potencial patogénico, este no se pudo estudiar en la presente tesis, pero sí existen algunos antecedentes bibliográficos. Wille *et al.* (2019) inoculó estos virus en aves de corral de 4 semanas de edad y no se detectaron signos clínicos de enfermedad en alguna de las aves, permaneciendo sanas hasta el día 21 post inoculación, sin embargo, mediante qRT-PCR se detectó virus en todos los pollos inoculados, excepto uno, inoculado con AVv18, pero hubo seroconversión en todas las aves, arrojando títulos HI de 8 a 32 UHA para el AVv17, mientras que para el AVv18 fueron de 4 a 8 UHA. Este bajo nivel de infección demostrado en aves de corral y aunque aún no se sabe lo que puedan causar en pingüinos Pygoscelidos, ni otras aves de vida silvestre, los estudios de Neira *et al.*, 2017 y Wille *et al.*, 2019 aislaron e identificaron estos virus desde pingüinos clínicamente sanos, lo que sugiere una baja patogenicidad (Olivares *et al.*, 2019), asimismo, los animales muestreados en este estudio estaban clínicamente sanos.

Cabe destacar que en todos los estudios hasta el momento coinciden en que el AVv18 es el menos detectado y el AVv17 presenta un porcentaje superior de detección y que se requieren más estudios para poder entender las diversas incógnitas que se van presentando. Una limitación en este estudio es la poca cantidad de muestras obtenidas y la nula toma de muestra en pingüinos Adelia en la mayoría de las zonas, a excepción de isla Ardley. Lo anterior se debe a las condiciones climáticas variables y dificultosas, que se presentan en expediciones de zonas como la Antártica, el limitado tiempo que se disponía para realizar el muestreo y el poco personal que es autorizado para llevarlo a cabo.

## CONCLUSIÓN

En conclusión, la hipótesis resultó ser rechazada ya que, en solo uno (AVv17) se obtuvo resultados positivos, es decir, anticuerpos presentes en suero que reaccionaron contra el virus, obteniendo un título  $HI \geq 4$  UHA, además, en solo una de las especies de pingüinos mencionadas (Papúa).

Para comprender estos resultados, fue necesario comprender un poco más acerca de las diferencias biológicas que existen entre las especies de pingüinos, y de esta manera poder caracterizarlos de mejor manera, como las especies distintas que son.

Los resultados positivos fueron tan escasos (0,83%) sólo para AVv17 y nulos para AVv18, que no se proyectó la existencia de diferencias en análisis estadísticos entre zonas de muestreo, pues las zonas son estadísticamente similares.

Como toda investigación, siempre es interesante seguir ampliando la información obtenida, uno de los temas podría ser la transmisión entre estas aves y el rol que tienen depredadores en ello, o incluso, el efecto del cambio climático sobre estas aves y estos virus descubiertos.



## BIBLIOGRAFÍA

- **AUSTIN, F.; WEBSTER, R.** 1993. Evidence of ortho- and paramyxoviruses in fauna from Antarctica. *Journal of Wildlife Diseases*. 29(4):568-571.
- **BAUMEISTER, E.; LEOTTA, G.; PONTORIERO, A.; CAMPOS, A.; MONTALTI, D.; VIGO, G.; PECORARO, M.; SAVY, V.** 2004. Serological evidences of influenza A virus infection in Antarctica migratory birds. *International Congress Series*. 1263:737–740.
- **CHIONG, MARIO.; LEISEWITZ, ANDREA.; MÁRQUEZ, FERNANDO.; VIRONNEAU, LESLIE.; ÁLVAREZ, MARCO.; TISCHLER, NICOLE.; PIÑONES, OSVALDO.; MORENO, RICARDO.** 2018. Manual de Normas de Bioseguridad y Riesgos Asociados. [en línea]. Santiago, Chile. <[https://www.conicyt.cl/fondecyt/files/2018/06/Manual- Bioseguridad- junio\\_2018.pdf](https://www.conicyt.cl/fondecyt/files/2018/06/Manual-Bioseguridad-junio_2018.pdf)>. [consulta: 28-10-2020].
- **COUVE, E.; VIDAL, C.; RUIZ, J.** 2016. Aves de Chile sus islas oceánicas y península Antártica. *Far south*. Punta Arenas, Chile. 554 p.
- **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*. 14:169-171.
- **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):00472–00517.
- **HURT, A.; VIJAYKRISHNA, D.; BUTLER, J.; BAAS, C.; MAURER, S.; SILVA, M.; MEDINA, G.; OLSEN, B.; KELSO, A.; BARR, I.; GONZALEZ, D.** 2014. Detection of evolutionarily distinct Avian influenza A viruses in Antarctica. *MBio*. 5(3), e01098–01014.
- **HURT, A.; SU, Y.; ABAN, M.; PECK, H.; LAU, H.; BAAS, C.; DENG, Y.; SPIRASON, N.; ELLSTROM, P.; HERNANDEZ, J.; OLSEN, B.; BARR, I.; VIJAYKRISHNA, D.; GONZALEZ, D.** 2016. Evidence for the introduction,

- reassortment, and persistence of diverse Influenza A viruses in Antarctica. *Journal of Virology*. 90(21):9674–9682.
- **ICTV**. 2018. Taxonomy of the order Mononegavirales: update 2018. *Archives of Virology*. [en línea]. <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00705-018-3814-x>>. [consulta: 20-06-2019].
  - **ISRAEL, L.** 2015. Geología de President Head, Isla Snow, archipiélago Shetland del Sur, Antártica. Memoria Título Geólogo. Santiago, Chile. U. Chile, Fac. De Cs. Físicas y Matemáticas. 117 p.
  - **TYLER, JOSHUA; BONFITTO, MATTHEW.; CLUCAS, GEMMA.; REDDY, SUSHMA.; YOUNGER, JANE.** 2020. Morphometric and genetic evidence for four species of gentoo penguin. *Ecology and Evolution*. 00:1-11.
  - **KNIFE, D.; HOWLEY, P.** 2013. *Fields virology*. 6ta edición, volumen 1. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, EEUU. Cap 33 pág. 957.
  - **KUHN, J.; VERDUGO, C.; NG, T.; KUMAR, S.; CHOI, K.; THOMAZELLI, 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\\_ssrna-\\_viruses/m/animal\\_rna\\_minus\\_ec\\_approved/6948](https://talk.ictvonline.org/files/proposals/animal_dsrna_and_ssrna-_viruses/m/animal_rna_minus_ec_approved/6948)>. [consulta: 03-07-2019].
  - **LEE, S.; KIM, J.; PARK, Y.; SHIN, O.; KIM, H.; CHOI, H.; SONG, J.** 2014. A novel adenovirus in Chinstrap penguins (*Pygoscelis antarctica*) in Antarctica. *Viruses*. 6(5):2052–2061.
  - **LEE, S.; KIM, J.; SEO, T.; NO, J.; KIM, H.; KIM, W.; CHOI, H.; KANG, S.; SONG, J.** 2016. Genetic and molecular epidemiological characterization of a novel adenovirus in Antarctic penguins collected between 2008 and 2013. *Plos One* 11(6):1-11.
  - **MILLER, P.; AFONSO C.; SPACKMAN, E.; SCOTT, M.; PEDERSEN, J.; SENNE, D.; BROWN, J.; FULLER, C.; UHART, M.; KARESH, W.; BROWN, I.; ALEXANDER, D.; SWAYNE, D.** 2010. Evidence for a New Avian

- Paramyxovirus Serotype 10 Detected in Rockhopper Penguins from the Falkland Islands. *Journal of Virology*. 84(21):11496–11504.
- **MORGAN, I.; WESTBURY, H.** 1981. Virological Studies of Adelie Penguins (*Pygoscelis adeliae*) in Antarctica. *Avian Diseases*. 25(4):1019-1026.
  - **MORGAN, I.; WESTBURY, H.; CAPLE, I.; CAMPBELL, J.** 1981. A survey of virus infection in sub-Antarctic penguins on Macquarie Island, Southern Ocean. *Australian Veterinary Journal*. 57:333-335.
  - **MURA-JORNET, I.; PIMENTEL, C.; DANTAS, G.; PETRY, M.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; BARBOSA, A.; VIANNA, J.** 2018. Chinstrap penguin population genetic structure: one or more populations along the Southern Ocean?. *BMC Evolutionary Biology*. 18(1):90.
  - **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.
  - **ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS).** 2005. Manual de bioseguridad en el laboratorio. [en línea]. <[https://www.who.int/topics/medical\\_waste/manual\\_bioseguridad\\_laboratorio.pdf](https://www.who.int/topics/medical_waste/manual_bioseguridad_laboratorio.pdf)> [consulta: 11-11-2020].
  - **ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE SANIDAD ANIMAL (OIE).** 2012. Newcastle disease. [en línea]. París, Francia. cap 2.3.14. **In:** Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees). <<http://www.oie.int/es/normas/manual-terrestre/>>. [consulta: 13-06-2019].

- **OLIVARES, F.** 2018. Determinación de infección contra *Avian avulavirus 19* en pingüinos del territorio Antártico Chileno. Memoria Médico Veterinario. Santiago, Chile. U. Chile. FAVET. 36 p.
- **OLIVARES, F.; TAPIA, R.; GÁLVEZ, C.; MEZA, F.; BARRIGA, G.; BORRAS, R.; MENA, J.; MEDINA, R.; NEIRA, V.** 2019. Novel penguin *Avian avulaviruses 17, 18 and 19* are widely distributed in the Antarctic Peninsula. *Transboundary and Emerging Diseases*.
- **PERTIERRA, L.; SEGOVIA, N.; NOLL, D.; MARTINEZ, P.; PLISCOFF, P.; BARBOSA, A.; ARAGÓN, P.; RAYA, A.; PISTORIUS, P.; TRATHAN, P.; POLANOWSKI, A.; BONADONNA, F.; LE BOHEC, C.; BI, K.; WANG-CLAYPOO, C.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; DANTAS, G.; BOWIE, R.; POULIN, E.; VIANNA, J.** 2020. Cryptic speciation in gentoo penguins is driven by geographic isolation and regional marine conditions: Unforeseen vulnerabilities to global change. *Diversity and Distributions*. 26:958-975.
- **SECRETARÍA DEL TRATADO ANTÁRTICO (STA).** 2011. Protección y gestión de zonas / sitios y monumentos históricos. [en línea]. <[https://www.ats.aq/s/ep\\_protected.htm](https://www.ats.aq/s/ep_protected.htm)>. [consulta: 22-05-2019].
- **SECRETARÍA DEL TRATADO ANTÁRTICO (STA).** 2019. Tratado Antártico. [en línea]. <<https://ats.aq/s/antarctic treaty.html>>. [consulta: 16-09-2019].
- **SPACKMAN, E.** 2014. Animal influenza virus. Springer Science. Segunda edición. Nueva York, Estados Unidos. 425 pp.
- **SMEELE, Z.; AINLEY, D.; VARSANI, A.** 2018. Viruses associated with Antarctic wildlife: From serology based detection to identification of genomes using high throughput sequencing. *Virus Research*. 243:91-105.
- **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.

- **VAN DOORSLAER, K.; RUOPPOLO, V.; SCHMIDT, A.; LESCROËL, A.; JONGSOMJIT, D.; ELROD, M.; KRABERGER, S.; STANTON, D.; DUGGER, K.; BALLARD, G.; AINLEY, D.; VARSANI, A.** 2017. Unique genome organization of non-mammalian papillomaviruses provides insights into the evolution of viral early proteins. *Virus Evolution*. 3(2):1-12.
- **WILLE, M.; ABAN M.; WANG, J.; MOORE, N.; SHAN, S.; MARSHALL, J.; GONZALEZ, D.; VIJAYKRISHNA, D.; BUTLER, J.; WANG, J.; HALL, R.; WILLIAMS, D.; HURT, A.** 2019. Antarctic penguins as reservoirs of diversity for *Avian avulaviruses*. *Journal of Virology*. 93(11):e00271-19.

## ANEXOS

### 1: Descripción de sitios muestreados.

**Grupa del León** (ZAEP N°151): se encuentra en la costa Suroeste de la Isla Rey Jorge. Es representativo de hábitats terrestres de la Antártica, donde se puede medir la perturbación de lugares situados cerca de zonas con actividad humana. Contiene doce colonias reproductoras de aves nativas, entre ellos tres especies de pingüinos: Adelia (*Pygoscelis adeliae*) con 3.751 parejas reproductoras, Papúa (*Pygoscelis papua*) con 3004 parejas reproductoras y Barbijo (*Pygoscelis antarcticus*) con 32 parejas reproductoras.

**Isla Ardley** (ZAEP N°150): ubicada en la costa Suroeste de la isla Rey Jorge, casi a 500 m al Este de la costa de la península Fildes, bahía Maxwell. La isla tiene cerca de 2,0 km de longitud y 1,5 km en su sección más ancha. También contiene colonias de pingüinos Pygoscelidos y es uno de los pocos lugares donde las tres especies se reproducen simpátricamente. Los reproductores de pingüino Papúa se acercan a las 5.000 parejas, una de las colonias reproductoras más grande de las Islas Shetland del Sur y posiblemente de la Antártica.

**Punta Armonía** (ZAEP n°133): localizada en la costa Oeste de la isla Nelson, entre la isla Rey Jorge (al Noreste) y la isla Robert (al Sudoeste). Las áreas libres de hielo albergan importantes colonias reproductivas de 12 especies de aves, entre las que se destaca una de las colonias más grandes de pingüino de Barbijo (*Pygoscelis antarcticus*) de la Antártica con 89.685 parejas reproductoras.

## **2: Principales medidas de bioseguridad en laboratorios nivel 2**

Los laboratorios de bioseguridad nivel 2 cumplen con los requisitos de un laboratorio de nivel 1 y, además, deben adecuarse para trabajar con agentes patógenos de riesgo potencial moderado para el personal y el ambiente (Chiong *et al.*, 2018).

El personal debe tener entrenamiento específico en el manejo de agentes patógenos y debe ser supervisado por científicos competentes. Son imprescindibles las medidas de protección personal como el uso de delantal en todo momento, guantes para todos los procedimientos que involucran material biológico (y ser desechados antes de tocar otro objeto limpio), gafas de seguridad cuando sea necesario proteger los ojos y el rostro de salpicaduras, e impactos, uso de calzado cerrado y pantalones o vestidos largos, pelo largo tomado despejando así la cara; no llevarse las manos a la cara, pelo, lentes cuando se esté trabajando en el laboratorio; utilizar dispositivos diseñados para pipetear, jamás la boca. Lavarse las manos después de terminar cada procedimiento, al cambiar de tarea y al salir del laboratorio; no apoyar mochilas, carteras ni ropa (como chalecos, chaquetas) en los mesones de trabajo; no se debiera utilizar en ningún caso la ropa de trabajo como delantal, guantes, etc., fuera del laboratorio (Chiong *et al.*, 2018).

En lo posible, los laboratorios se deben ubicar apartados de las áreas de uso público, deben tener acceso limitado, mantener la puerta cerrada y con símbolo de riesgo biológico. Las actividades se deben realizar en cabinas de seguridad biológica adecuadas según agente de riesgo, su uso debe prevenir la exposición a aerosoles y del mismo modo se debe evitar su formación con especial cuidado al destapar/tapar tubos y aspirar líquidos; los lugares, contenedores o equipos que están en contacto o por los que circula material potencialmente del grupo de riesgo II o superior, deben señalizarse con el símbolo internacional de peligro biológico; el centrifugado de material infeccioso debe realizarse en centrífugas con capachos de bioseguridad; las superficies deben ser descontaminadas con desinfectantes efectivos; el uso de material cortopunzante debe reducirse a casos para los cuales no existe otra alternativa y ser depositados en recipientes resistentes a la perforación; el transporte de las muestras dentro del laboratorio debe realizarse de forma tal que, en caso de caída, no se produzcan salpicaduras ni aerosoles (en gradillas y recipientes cerradas, etc.) (Chiong *et al.*, 2018).

Es responsabilidad de todo el personal del laboratorio separar, manipular y eliminar adecuadamente todos los desechos desde que se generan hasta su disposición final; todos los materiales que han estado en contacto con material biológico se descontaminan, mediante procesos de autoclavar, incinerar o inactivación química. La eliminación final de desechos biológicos está normada por el Decreto Supremo N°148 de 2003 del Ministerio de Salud, que aprueba el Reglamento Sanitario sobre Manejo de Residuos Peligrosos. Todos los desechos deben colocarse en recipiente con tapa. Los desechos de material biológico contaminado deben ser inactivados previo a su eliminación. En el caso que la desinfección se realiza en un lugar externo, el material debe ser transportado desde el laboratorio en recipiente herméticamente cerrado (OMS, 2005). Finalmente, el personal debiese respetar y hacer cumplir todo lo anterior involucrándose personalmente en la prevención de riesgos (Chiong *et al.*, 2018).



### 3: Certificado de Bioseguridad




#### CERTIFICADO N° 166

Santiago, 25 de noviembre 2020.-

El Comité de Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile ha revisado el proyecto "**Detección de anticuerpos séricos contra Avian avulavirus 17 y 18 en poblaciones de pingüinos de las Islas Shetland del Sur, Antártica**", que forma parte del proyecto concursable INACH 46-16, del investigador responsable Dr. Víctor Neira Ramírez, académico del Departamento de Medicina Preventiva Animal de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

La evaluación del citado proyecto permite acreditar que las normas de bioseguridad que se encuentran descritas en el mismo y en el formulario de solicitud de certificados de bioseguridad de FAVET, son las adecuadas según las especificaciones contenidas en el "Manual de Normas Bioseguridad y Riesgos Asociados Fondecyt – CONICYT, versión 2018 y en el "Manual de Bioseguridad en el Laboratorio, de la Organización Mundial de la Salud (versión 2005)", que previenen los riesgos para las personas, los animales y el medioambiente.

Se otorga el presente certificado a solicitud del interesado, para los fines que estime conveniente.



Dr. José Pizarro Lucero  
Coordinador  
Comité de Bioseguridad  
FAVET – Universidad de Chile

## 4: Certificado de Bioética



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 realizará 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 encontrará 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 CO<sub>2</sub>. 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.

d) Como elementos de protección personal para el procesamiento de la muestra se utilizarán delantal, guantes y protección visual y cuando se trabaje en el Laboratorio BSL3 se utilizará un buzo Tivek de cuerpo completo, cubre zapatos, pechera, cubre mangas, cubre cabello, mascarilla, respiradores personales de presión positiva con filtro HEPA y doble guante.

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 aviarias 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 XVI<sup>ta</sup> 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