UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
INSTITUTO DE PATOLOGÍA ANIMAL

DETERMINACIÓN DE PREVALENCIA DE VIRUS POBLACIÓN DE CISNES DE CUELLO NEGRO (*Cygnus melancoryphus*) DEL SECTOR "SAN RAMÓN" DEL SANTUARIO DE LA NATURALEZA "CARLOS ANWANDTER", VALDIVIA.

Memoria de Título presentada como parte de los requisitos para optar al TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO.

SUSAN LORENA DÍAZ PÉREZ
VALDIVIA-CHILE
2006

PROFESOR PATROCINANTE: Dr. Jorge Ulloa H.

Nombre Firma

PROFESOR COPATROCINANTE: Dr. Héctor Hidalgo O.

Nombre Firma

COLABORADORES: Dr. Cristián Mathieu B.

Nombre Firma

Carlos Hernández M.

Nombre Firma

Claudio Verdugo R.

Nombre Firma

PROFESOR CALIFICADOR: Dra. Carla Rosenfeld M.

Nombre Firma

PROFESOR CALIFICADOR: Dr. Roberto Schlatter V.

Nombre Firma

FECHA APROBACIÓN: 10 de Mayo del 2006

"Sólo cuando el último árbol esté muerto, el último río envenenado, y el último pez atrapado, te darás cuenta que no puedes comer dinero". **Evelyn Waugh**

ÍNDICE

Capítulo	Página
1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. MATERIAL Y MÉTODOS	17
5. RESULTADOS	23
6. DISCUSIÓN	26
7. BIBLIOGRAFÍA	28
8. ANEXOS	35
9. AGRADECIMIENTOS	46

1. RESUMEN

En el presente trabajo se realizó una pesquisa de cuatro agentes virales: Influenza aviar, virus de la enfermedad de Newcastle (ENC), virus Viruela aviar y Adenovirus tipo I en la población de cisnes de cuello negro *(Cygnus melancoryphus)* del sector "San Ramón" del Santuario de la Naturaleza Carlos Anwandter. El número muestral fue determinado en 77 aves mediante el programa EPIINFO 6.04 . Se tomaron muestras de 77 cisnes (tórulas cloacales y traqueales, además de sangre obtenida de la vena braquial) capturados entre Octubre del 2004 a Marzo del 2005.

Para determinar la presencia de virus Influenza aviar y virus de la ENC se usó una suspensión de las muestras cloacales y traqueales que se inocularon en huevos embrionados libres de patógenos específicos (SPF), vía saco alantoídeo. Con el suero se realizaron las pruebas de Inhibición de la hemoaglutinación (usando 4 unidades hemoaglutinantes) para detectar anticuerpos contra la ENC, inmunodifusión en agar gel para Adenovirus tipo I, Viruela aviar e Influenza aviar.

En los huevos embrionados inoculados no se detectó presencia de actividad viral.

El test de inhibición de la hemoaglutinación evidenció una serie de títulos de anticuerpos para virus de la ENC en un rango de 4 a 256, con una seroprevalencia de 42,85%. En la prueba de inmunodifusión se encontró una seroprevalencia de 22,02% a adenovirus, mientras que Viruela aviar e Influenza aviar resultaron negativos.

Los anticuerpos para virus de la ENC encontrados en la muestra pueden tener su origen en el contacto, tanto con cepas vacunales como con cepas de campo, sin embargo las aves muestreadas no presentaron signos clínicos de enfermedad.

Palabras claves: Cisne de cuello negro, pesquisa de prevalencia de virus de la enfermedad de Newcastle, Influenza aviar, Adenovirus tipo I y virus Viruela aviar.

2. SUMMARY

VIRUS PREVALENCE ASSESSMENT FOR A POPULATION OF BLACK-NECKED SWAN FROM THE WETLAND SECTOR SAN RAMON OF THE "CARLOS ANWANDTER" NATURE SANCTUARY, VALDIVIA.

A survey of four viral agents: Avian flu, Newcastle disease, Avian pox and Adenovirus type I was pursued on a population of Black-necked swans caught between October 2004 and March 2006 on the "San Ramón" sector of the Nature Sanctuary Carlos Anwandter wetland. Seventy seven swans were calculated to be an optimum statistical population sample by means of the EPIINFO 6.04 software. Thus 77 samples, cloacal and traqueal smears, plus blood from the braquial vein were taken from those swans.

Presence of Avian flu and Newcastle viruses were determined based on cloacal and traqueal smear suspensions, inoculated into the allantoic sac of developing Pathogen free bird eggs. With the blood serum haemoaglutination-inhibition tests (using 4 haemoaglutinant units) were processed for detecting antibodies against Newcastle. Immunodiffution with agar gel was practiced for Adenovirus type I, Avian pox and Avian flu.

On the inoculated embrionated eggs no presence of viral activity was detected

The haemoaglutination-inhibition test evidenced a series of antibody titles for Newcsatle virus on a range between 4 and 256, with a seroprevalence of 42,85%. The immunodiffution tests showed a seroprevalence of 22,02% to adenovirus, whereas Avian flu and Avian pox resulted negative.

Newcastle antibodies could have originated by bird contacts with vaccine strains as well as with rural strains (non vaccine or laboratory originated strains). Surveyed birds did not present signs of the disease.

Key words: Black-necked swan, prevalence survey for Newcastel virus, Avian influenza, Adenovirus type I and Avian pox.

3. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades e infecciones que afectan a la fauna silvestre en Chile son poco conocidas; y demandan un estudio más profundo. A través de la historia se ha visto una reducción de los ambientes en los cuales se desarrolla la vida silvestre, por lo que la fauna se ha visto obligada a compartir espacios más reducidos y a entrar en contacto más estrecho con el ser humano; esto a favorecido la propagación de enfermedades tanto en el hombre como en los animales. De igual modo, la facilidad en el desplazamiento de personas y animales a grandes distancias conlleva un riesgo de introducción de enfermedades exóticas (Acha y Szyfres 1977).

El conocimiento de las enfermedades que aquejan a nuestra fauna silvestre autóctona es un paso necesario para una mejor prevención y control de estas en los animales domésticos y en humanos.

3.1. SANTUARIO DE LA NATURALEZA E INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA "CARLOS ANWANDTER"

Corresponde a un sitio RAMSAR, que se ubica entre los 39°35'-39°47' S y los 73°07'-73°16' O; de 4877 há de superficie, 25 km de largo y 2 km de ancho en promedio (Figura 1)

Chile ratificó la convensión Ramsar como Ley de la República a través del D.L. N° 3485 del 10 de septiembre de 1980 del Ministerio de Relaciones exteriores, y mediante el D.S. N° 2734 del 3 de junio de 1981, del Ministerio de Educación, fue declarado Santuario de la Naturaleza e Investigación Científica al lecho, islas y zonas de inundación del río Cruces y Chorocamayo, entre el extremo norte de la Isla teja por el sur y 2 km. al norte del castillo San Luis de Alba (Chile 1999).

Este lugar se formó producto del gran terremoto que afectó a Valdivia en mayo de 1960 y que redujo la elevación del terreno en alrededor de 1 a 2 mts.

El santuario corresponde a un estuario, pero recibe una cantidad significativa de agua dulce del Río Cruces y sus afluentes, tales como el Nanihue, Cudico, Pichoy, Cayumapu y San Ramón (Di Marzio y McInnes 2005).

En el santuario se ha determinado la presencia de alrededor de 60 especies diferentes de aves (Schlatter y col 1991, Salazar 1988); entre las que destacan el cisne de cuello negro, varias especies de patos como el pato jergón *(Anas flavorostris)*, pato real *(Anas silbilatrix)*, pato cuchara *(Anas platalea)*, pato negro *(Netta peposaca)* y pato anteojillo *(Anas specularis)*. De los zambullidores se pueden mencionar al pimpollo *(Podiceps rolland)*, picurio

(Podilymbus podiceps) y huala *(Podiceps major)*. También se encuentra la tagua común *(Fulica armillata)*, tagua de frente roja *(Fulica rufifrons)*, tagüita *(Porphyriops melanops)* y pidén *(Rallus sanguinolentus)*. Entre las garzas se pueden ver la garza grande *(Casmerodius albus)*, garza chica *(Egretta thula)*, huairavo *(Nycticorax nycticorax)* y huairavillo *(Ixobrychus involucris)*. Entre otras especies de aves destacan el yeco *(Phalacrocórax olivaceus)*, gaviota cahüil *(Larus dominicanus)*, piquerito blanco *(Sterna trodeaui)* y águila pescadora *(Pandion haliaetus)* esta última migrante del hemisferio norte (Salazar 1988), de origen neártico también tenemos al pitotoi grande *(Tringa melanoleuca)*, pitotoi chico *(Tringa flavipes)*, zarapito *(Munenius phaeopus)*, zarapito de pico recto *(Limora haemartica)*, playero blanco *(Calidris alba)*, playero de Baird *(Calidris bairdii)*, Playero pectoral *(Calidris melanotos)* otros playeros *(Calidris sp)*, pollitos de mar *(Phalaropus sp y Steganopus sp)*, chorlos *(Pluvialis sp)* y la Gaviota de Franklin *(Larus pipixcan)* (*).

Entre las especies carnívoras se cuenta el huillín *(Lutra provocax)*, el lobo común *(Otaria flavescens)* y dentro de los mamíferos herbívoros destaca el coipo *(Myocastor coipus)* (Salazar 1988).

Dentro de la fauna de peces se encuentra principalmente la carpa *(Cyprinus carpio)* que es una especie introducida.

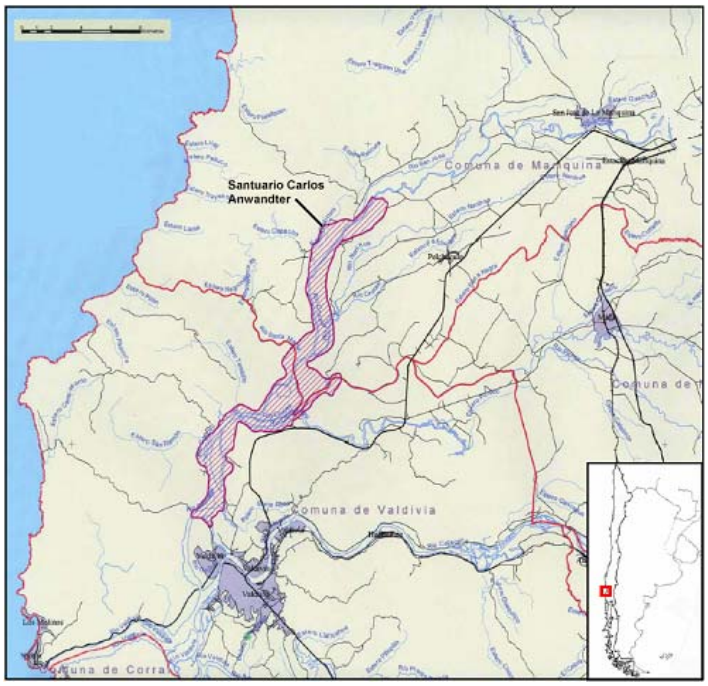


Figura 1.Localización del Santuario de la Naturaleza, modificado de Di Marzio y McInnes (2005)

(*): Comunicación personal Dr. Roberto Schlatter Instituto de Zoología de la Universidad Austral de Chile

Los humedales son definidos también como los "riñones del planeta", y se encuentran dentro de los ecosistemas más importantes. Es reconocido su valor para la protección de la pesca y fauna silvestre, además de ser fuente de una gran cantidad de material químico, biológico y genético; retienen nutrientes, como sedimentos y contaminantes y sirven a su vez de estabilizadores de las condiciones climáticas locales, como lluvia y temperatura. Además sustentan una importante diversidad biológica y constituyen en muchos casos un hábitat críticos para especies seriamente amenazadas y tienen la capacidad de albergar grandes poblaciones (Espejo 2005).

La Oficina de la Convención Ramsar determinó mediante los valores de uso y de no uso el valor económico de los humedales (Barbier y col 1997) (Tabla 1)

Tabla 1. Valor económico de los humedales

Valores de uso			Valores no uso
Valor de uso directo	Valor de uso indirecto	Valor de opción/ cuasiopción	Valor de existencia
• Pesca • Agricultura • Recreación • Transporte • Explotación de la flora y fauna silvestres • Turba/energía	• Retención de nutrientes • Control de crecidas /inundaciones • Protección contra tormentas • Recarga de acuíferos • Apoyo a otros ecosistemas • Estabilización del microclima • Estabilización de la línea de costa, etc.	• Posibles usos futuros (directos e indirectos) • Valor de la información en el futuro	• Biodiversidad • Cultura patrimonio • Valores de legado

Los valores de uso directo son los que más fáciles de medir; debido al uso comercial de estos, el caso de los indirectos, son funciones ecológicas reguladoras, las cuales no se comercializan por lo que su valor económico es difícil de medir; sin embargo estas funciones ecológicas reguladoras, reducen determinados daños materiales ; el valor de opción es una categoría especial que corresponde a un valor previsto de la información que se puede obtener aplazando la conversión y explotación del humedal. Ahora los valores de no uso, corresponde a una valor intrínseco de existencia, que es un valor extremadamente difícil de medir, ya que proviene de apreciaciones subjetivas ajenas del uso actual del humedal; los valores de legado son aquellos valores que se asignan para el uso de generaciones venideras (Barbier y col 1997). Este esquema permite entregar un valor económico al santuario; por lo que el estudio

de las especies que habitan en él es también parte importante para entregar un valor económico medible, y de esta manera poder justificar mejor aun su protección.

3.2. CISNE DE CUELLO NEGRO *(Cygnus melancoryphus)*

Es el ave acuática más grande que se conoce en el país. Su plumaje es completamente blanco a excepción del cuello y cabeza, que son negros. La ranfoteca es gris-azulosa cuya base superior presenta una carúncula roja, que en los machos tiende a ser más abultada; sus patas son palmeadas y de color rosado (Watson 1975, Blake 1977,Araya y Millie 1986, Birkhead y Perrins 1986, Venegas 1991, Chile 2005 [a]).

El cisne de cuello negro (*Cygnus melancoryphus*), pertenece al orden Anseriformes, familia Anatidae y se distribuye geográficamente en América del Sur, encontrándose en Chile principalmente entre la IV a la VII región (Chile 2005 [b]) Aunque Araya y Millie (1986) y Blake (1977) señalan que su distribución es desde Atacama hasta Tierra del Fuego y que casualmente se ve en el archipiélago Juan Fernández. Su hábitat, son lagos y zonas costeras. El período de incubación sus huevos es de 36 días y pone de 4 a 8 huevos (Olsen 1994). Su longitud corporal es de 1,2 mts y alcanza pesos de 5 a 8 kgs. Su longevidad es de 25 años, (Chile 2005 [b]) y su estado de conservación se encuentra registrado en el Apéndice II del la Convención sobre el Comercio Internacional de Flora y Fauna Silvestres, (CITES) (Cites 2005), aprobado en el DS 141/1.975 y que señala que es una especie que no está en peligro de extinción, pero que podría llegar a estarlo.

El cisne de cuello negro es una especie gregaria y herbívora oportunista, pero para organizar territorios reproductivos necesita de humedales estables de una profundidad no mayor a 1,5 m, vegetación sumergida, y manchones de vegetación emergente para nidificar. (Schlatter y col 1997); estas características corresponden en su totalidad al Santuario. La principal fuente alimenticia es el luchecillo *(Egeria densa)* (Corti 1996, Do Nascimento y col 2001, Corti y Schlater 2002)

La colonia residente en el santuario era muy numerosa y debido a la contaminación ambiental ocurrida el 2004 que provocó la muerte del luchecillo (*Egeria densa*) principal alimento de esta ave (Chile 2005 [a]), se vio muy afectada, al punto de ver disminuida su población de 5091 en el año 2004 a 615 el 2005 (Chile 2005 [a]) (Tabla 2).

Tabla 2. Censo poblacional de cisnes de cuello negro en el Santuario de la Naturaleza entre los años 1988-2005 (2000 y 2005 [a]).

Año	Promedio	Método de censo
1988	2183	1
1989	4371	1
1990	4319	1
1991	2881	1
1992	2168	1
1993	2403	1
1994	5096	1
1995	6128	1
1996	6329	1
1997	5299	1
1998	5469	1
1999	4803	1
2000	5636	1
2001	4767	1
2002	5777	1
2003	5724	1
2004	5226	2
2005	615	2

Método: 1.- Conteo a pie y en vehículo; el número se determinó por conteo directo mediante miradores y puntos altos circundantes, que permiten ver todo el cuerpo de agua. (Chile 2000).
2.- Censo aéreo mediante avioneta Cessna (Chile 2005[a])

Además esta ave se puede encontrar en Sudamérica en diferentes humedales, como en el Lagoa do Peixe Brazil; en Bañados del Este Uruguay; Buenos Aires, complejo Laguna la Lampa, en laguna Llancanelo en Mendoza, Laguna Blanca en Neuquen Argentina, y en Las Malvinas Reino Unido (Schlatter y col 2002)

Los estudios que existen sobre las patologías que afectan al cisne de cuello negro en poblaciones silvestres en Chile es escasa, la información que existe es reciente y tiene relación con pesquisa de patologías virales como Influenza aviar y Enfermedad de Newcastle (Alvarado 2003) y patología de alas de ángel (Alvarado 2005). Además se han determinado valores bioquímicos (Boettcher 2004) y valores hematológicos (Verdugo 2004) para análisis clínico.

3.3. ENFERMEDADES

3.3.1. Influenza Aviar

La primera vez que se describe la enfermedad es en Italia hace más de 100 años, en Estados Unidos fue reconocida en 1924-1925 (Cortés 2002). Influenza aviar, corresponde a un síndrome ocasionado por virus influenza tipo A, miembro de la familia *Orthomyxoviridae*. (Webster y col 1992, Easterday y col 2000). Es un virus RNA de una sola cadena con 8 genes que codifican 10 proteínas. La superficie es de 2 glicoproteínas: hemoaglutinina y neuroaminidasa. Hay 15 hemoaglutininas reconocidas (H1 a H15) y 9 neuraminidasa (N1 a N9). Los subtipos H5 y H7 son conocidos por ser altamente patógenos en aves (Swayne y King 2003). Se han encontrado numerosos subtipos del virus tipo A en las aves y a este hecho notable se le atribuye el gran potencial para originar combinaciones antigénicas. Estos virus tienen alta proclividad a cambiar genéticamente, lo cuál, contribuye a la transmisión interespecie y al alto potencial zoonótico que poseen; estos cambios pueden ocurrir mediante dos mecanismos: mutaciones aleatorias en el genoma; especialmente en la hemoaglutinina; lo que puede ocurrir gradualmente en el tiempo; y recombinaciones de 8 genes del virus al infectar dos virus una misma célula, dando como resultado virus híbridos (Swayne y King; 2003).

La gran diversidad de virus Influenza se encuentran en aves silvestres de los órdenes Anseriformes y Charadriformes (playeras) y ocasionalmente en otras especies acuáticas. La infección en estas aves es generalmente subclínica y estas especies sirven como reservorios primarios de virus Influenza. Los ancestros de los pollos (Galliformes) no son huéspedes naturales del virus (Webster y col 1992, Sharp y col 1997, Cortés 2002, Swayne y King 2003, Widjaja y col 2004).

La influenza aviar causada por subtipos altamente patógenos, es una enfermedad de gran impacto en aves domésticas con una mortalidad de alrededor de un 100%;sin embargo, no todas las aves son totalmente susceptibles a la enfermedad clínica. Las aves acuáticas son conocidas por ser más resistentes a la enfermedad y actuar como reservorio para el virus. La razón de que estas aves sean resistentes a la enfermedad y actúen como reservorio aun no esta clara, una de las teorías para explicar este fenómeno tiene relación con el sitio de escisión o clivaje de la molécula precursora de la hemoaglutinina, que es esencial para conferir infectividad a las partículas virales. Una posible explicación es que las aves acuáticas carecen de una proteasa ubicua capaz de provocar la escisión necesaria para la activación viral (Capua y Mutenelli 2001).

Un estudio realizado en 1996 con muestras recolectadas en patos silvestres en Canadá durante 15 años; demostró la posibilidad de que exista una coinfección de diferentes cepas en una misma ave, encontrándose hasta tres cepas diferentes en patos, lo que demuestra lo adaptado que se encuentra este virus a las aves acuáticas (Sharp y col 1997).

Además los virus de la Influenza se han aislados de aves domésticas (pollos, patos, pavos) y de aves de vida libre, tales como gaviotín boreal *(Sterna hirundo)*, Fardela del pacífico *(Puffinus pacificus)*, patos silvestres y otras especies, (OIE 2004).

Existen evidencias de infección de aves silvestres antes de la década del 70, que permite reconocer el alto índice de infección entre las aves acuáticas migratorias. Los estudios de vigilancia epidemiológica han demostrado que poseen todos los subtipos antigénicos conocidos de virus Influenza tipo A. La replicación intestinal de los virus en estas aves puede ser un factor importante en la transmisión eficaz entre las aves acuáticas y potencialmente a otras especies. Este reservorio en la vida silvestre desempeña una función importante en la ecología de la influenza (Easterday y col 2000). El virus Influenza A se transmite principalmente por contacto directo, por fecas y aerosoles de las aves infectadas y los cuerpos de agua contaminados con virus por las heces son una fuente muy importante de exposición para las aves acuáticas (Webster y col 1978, Webster y col 1992, Ritchie y col 1995). La evidencia de transmisión vertical es limitada, se señala que los virus pueden estar presentes en la yema, clara y cáscara del huevo en el caso de huevos contaminados con heces provocando muerte embrionaria, por lo que la infección se ve limitada (Ritchie y Kripcarter 1995) por lo que no es de gran importancia epidemiológica.

Entre los años 1999 y 2000 ocurrieron en Italia 413 brotes de influenza aviar altamente patógena y entre las aves afectadas se cuentan gallinas, pavos, faisán de guineas, patos y gansos; la gran mayoría de los afectados murieron excepto las aves acuáticas; sólo un brote en la provincia de Padova se observó mortalidad en dos gansos domésticos *(Anser anser var. domestica*) y de dos patos criollo (*Cairina moschata*). Se aisló un virus alta patogenicidad subtipo H7N1 de los gansos y en el páncreas de los gansos se observó daño detectándose el virus mediante inmunocitoquímica. En los patos y gansos se observaron lesiones histopatológicas en el sistema nervioso central y detectándose la presencia del virus mediante inmunocitoquímica (Capua y Mutenelli 2001).

Además en Minnessota entre los años 1998 y 2000 se hizo un estudio de Influenza aviar en patos silvestres, se tomaron muestras de patos azulones (*Anas platyrhinchos)* y durante 1999 en patos de cola larga (*A. acuta).* Virus Influenza se aisló en 11%, 14% y 8% de las aves entre los años 1998, 1999 y 2000, respectivamente (Hanson y col 2003); en este estudio se menciona además la posibilidad de que las aves acuáticas no sean portadoras de todas las cepas de influenza aviar.

Una investigación realizada en Italia entre los años 1993-1999; demostró seroconversión e incluso diseminación del virus entre patos silvestres, cabe señalar que este estudio se realizó en los períodos de invierno, con el fin de estudiar su transmisión durante este período, se concluyó que el virus permanece circulando constantemente durante el invierno (De Marco y col 2003).

En el año 1998 en la costa oeste de Maryland se realizó una vigilancia epidemiológica en patos silvestres no migratorios residentes, se compararon los períodos entre julio-agosto y agosto-septiembre con resultados de 0% y 13,9% respectivamente. Estas aves se han

convertido en centinelas para la detección temprana del virus en la zona media sur de la ruta migratoria de las aves acuáticas (Slemons y col 2003). En un brote ocurrido en Minnesota en pavos, entre 1979 – 1980, se sospechó de una posible transmisión de las aves silvestres de la cepa H10N7 (Karunakara y col 1983).

Esta enfermedad ha demostrado ser una zoonosis, como lo han probado estudios recientes; entre los años 2003 – 2004 se demostró que patos domésticos en Asia fueron reservorios de la cepa H5N1 y que actuaron como propagadores de la enfermedad, hasta que esta cepa mutó, provocando altas mortalidades entre las aves (incluyendo aves acuáticas como los patos) y adquirió la capacidad de infectar al ser humano directamente desde las aves (Hulse-Post y col 2005). Esta misma cepa provocó muertes humanas en Asia. El primer acontecimiento de infección humana por un virus de la Influenza aviar fue documentado en Hong Kong, en 1997, cuando la cepa H5N1 ocasionó enfermedad respiratoria severa a 18 humanos, de los cuales 6 fallecieron. La infección en el hombre coincidió con una epidemia de Influenza aviar altamente patógena en la población avícola de Hong Kong, producida por la misma cepa. (OIE 2004); además, afectó no sólo a aves y seres humanos sino inclusive provocó la muerte de 33 tigres en un zoológico privado de Tailandia en Octubre del 2004; durante ese mismo año murieron 11 personas en Tailandia y 19 en Vietnam producto de esta cepa. (Thornley 2004).

En el año 2002 en Hong Kong; durante el brote de influenza aviar altamente patógena correspondiente a la cepa H5N1, la cepa se aisló mediante cultivo celular en un cisne de cuello negro que se encontraba en el parque Zoológico Kowloon, este ejemplar murió, esta ave se encontraba junto a 9 individuos más de los cuales no se aisló el virus, además murieron cinco ejemplares de cisne coscoroba (de un total de cinco), de todos ellos se aisló el virus (Trevor 2004).

En Chile, en el año 2002 se presentó un brote en la provincia de San Antonio en la V región, se afectaron los planteles de reproductoras y de pavos, en este único brote se sacrificaron 460.000 gallinas y 18.000 pavos, la totalidad de animales de los planteles afectados (Chile 2002) , produciéndose pérdidas de 20 millones de dólares aproximadamente, de los cuales 10 millones serían por pérdidas directas y el resto por cierre de mercados, a esto se le debe sumar los costos asumidos por el Estado para controlar la emergencia (Cortés 2002). Las cepas aisladas en este brote corresponden al subtipo H7N3 de alta y baja patogenicidad (Cortés 2002, Jones y Swayne 2004). A pesar de que no se pudo determinar el origen del brote se postula que pudo haber sido introducida por hospedadores de especie diferente a las gallinas (Jones y Swayne 2004). Se debe mencionar que esta es una enfermedad que se encuentra en la Lista única de la OIE.

Actualmente Chile se encuentra libre de Influenza aviar y cuenta con un programa de vigilancia en poblaciones de aves silvestres, especialmente acuáticas (Chile 2005[c]).

3.3.2. Enfermedad de Newcastle

El virus de la Enfermedad de Newcastle (ENC), es un virus RNA que pertenece a la familia *Paramixoviridae*, subfamilia *Paramixovirinae* y género *Rubulavirus* (Alexander 2000 [b]).

La Enfermedad de Newcastle, causada por un paramixovirus aviares perteneciente al serotipo 1 (APMV-1), se encuentra en la Lista única de la Oficina Internacional de Epizootias (Alexander 2000 [a], OIE 2005).Además se conocen otros ocho serotipos de paramixovirus aviares, numerados del APMV-2 al APMV-9. Buena parte de esos serotipos parecen estar presentes en reservorios naturales de determinadas especies aviares silvestres, aunque hay otras especies que suelen ser susceptibles y pueden ejercer de huéspedes. Sólo los serotipos APMV-2 y APMV-3 han tenido efectos sanitarios y económicos de cierta importancia para la producción avícola. Ambos tipos de virus provocan afecciones respiratorias y caídas de la producción de huevos, que pueden revestir cierta importancia cuando a sus efectos se suman los de otras infecciones o presiones ambientales. No se ha descrito ningún caso de infección natural de pollos por virus del tipo APMV-3. (Alexander 2000 [a]). La capacidad del virus de aglutinar eritrocitos, se debe a la fijación de la proteína hemoglutinina a los receptores de superficie de los eritrocitos, seguida de una digestión enzimática de estos receptores, lo que permite la posterior elusión o liberación del virus, este último proceso esta asociado a la enzima neuroaminidasa (Alexander 2000 [b]). El virus puede causar la hemoaglutinación de eritrocitos de reptiles, anfibios y aves; los eritrocitos de humano y cobayo son aglutinados por todas las cepas, mientras que los de bovinos, cerdos, ovejas y caballo son aglutinados sólo por algunas cepas (Gordon 1980).

El virus de la ENC es antigénicamente uniforme y los aislados se han clasificado conforme a su virulencia e importancia epizoótica, en cepas lentogénicas, mesogénicas y velogénicas; esta división es sólo aplicable para las gallinas domésticas (Gerlach 1994).

Existen dos principales reservorios de esta enfermedad: una forma avirulenta en aves acuáticas y otra altamente virulenta en aves tropicales. Los anseriformes presentan una baja susceptibilidad al virus en conjunto con otras aves acuáticas y rara vez desarrollan signos clínicos después de una infección. Se postula que estos animales han estado en contacto con este virus durante muchos años durante su evolución, ya que este sobrevive bien en agua de mar o en agua dulce (Carry y Cross 1991). En general se ha observado una falta de lesiones macroscópicas en patos y gansos domésticos (Palmer y Trainer 1977). En el ambiente acuático, la transmisión de la enfermedad ocurre principalmente por vía fecal-oral (Carry y Cross 1991), aunque todas las secreciones pueden ser infectantes por un tiempo variable (Ritchie y Kripcarter 1995).

Esta es una de las dos enfermedades más importantes en la producción avícola a nivel mundial, no sólo por la alta mortalidad que puede llegar a un 100%; sino también por el impacto económico que provoca producto de las restricciones comerciales que genera en las zonas donde se producen brotes (Aldous y Alexander 2001), por lo cual esta enfermedad se encuentra en la lista única de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE 2005). En Europa se

ha visto un incremento en el número de brotes en aves de producción reportados a la Oficina Internacional de Epizootias (Schelling y col 1999).

En Estados Unidos en el año 1970, se realizó un estudio en el que se encontró seropositividad al virus de la ENC, en patos mallards y cisnes cautivos, entre estos últimos se encontraban cinco ejemplares de cisne de cuello negro de los cuáles uno arrojó resultados positivos (Friend y Trainer 1970).

En Canadá entre los año 1995 y 2000, se muestrearon Cormoranes de doble cresta, los resultados del análisis de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), fueron virus virulentos pertenecientes al tipo APMV1 (Weingartl y col 2003).

En Suiza se han reportado aves acuáticas con seropositividad a virus de la ENC; entre las aves muestreadas se cuentan ánades azulones *(Anas platyrhynchos)*, patos colorados *(Aythya ferina)*, porrón común *(Aythya fuligula),* con porcentajes que varían entre un 5 y 6% (Schelling y col 1999).

En Argentina en el año 2005, se realizó un estudio sobre aves silvestres sanas entre las que se pueden contar gaviotas, pingüinos, patos, gansos, cuervos, cisnes, flamencos y palomas; se logró aislar el virus y se comprobó seroconversión en estas aves, el virus aislado resultó ser avirulento, en los cisnes muestreados se encontró un 35% positivos al test de inhibición de la hemoaglutinación (Zanetti y col 2005)

Chile se encuentra libre de esta enfermedad, desde el año 1975, por lo que mantener una vigilancia en poblaciones silvestres debe ser prioritario para asegurar el status zoosanitario del país (Chile 2005 [c]).

En el hombre virus de la ENC provoca una conjuntivitis transitoria (Ritchie y Kripcarter 1995) y el primer reporte de infección humana ocurrió en un accidente de laboratorio en 1942 (Swayne y King 2003).

3.3.3. Adenovirus tipo I

Respecto a Adenovirus tipo I, la literatura señala que se encuentra ampliamente distribuido por todo el mundo, pero que tienen participación principalmente como patógenos secundarios en relación a infecciones con el virus de la Anemia Infecciosa Aviar y el virus de la Infección de la Bolsa de Fabricio y que no tiene importancia conocida en el ámbito de la salud pública (McFerran 2000).

Los Adenovirus son virus no envueltos de 70 a 90 nm. de diámetro. Se replican en el núcleo de las células, donde se acumulan las partículas virales que forman cuerpos de inclusión intranucleares. Las varias cepas del Adenovirus afectan a mamíferos y aves. Las cepas que infectan mamíferos pertenecen al género Mastadenovirus, y las cepas que afectan a aves corresponden al género Aviadenovirus (Ritchie y Kripcarter 1995). Mastadenovirus

presentan actividad hemoaglutinante mientras que Aviadenovirus no la presentan (Gerlach 1994).

La clasificación de Adenovirus aviares presenta un grupo antigénico que los diferencia de los Adenovirus de los mamíferos (Ritchie y Kripcarter 1995). El género de los Adenovirus de las aves se divide en tres grupos, se acuerdo a antígenos comunes determinados por virus neutralización, según su crecimiento en cultivos celulares y características de su DNA (Gerlach 1994, Hess 2000).

Grupo I: tiene 12 serotipos; que han sido aislados de gallinas, pavos (con 3 serotipos), palomas, periquitos, patos, gallina de guinea, faisanes, gansos (3 serotipos).

Grupo II: El virus de la Enteritis Hemorrágica del Pavo, el virus Enfermedad del Bazo Moteado y el virus de la Esplenomegalia del Pollo. El antígeno común del grupo es distinto al del grupo I.

Grupo III: tiene sólo el virus asociado a la Salpingitis Infecciosa de Galliformes y similar a los virus aislados de patos; este subtipo del virus comparte algunos antígenos comunes con los del grupo I. Este grupo de Adenovirus aviares tiene actividad hemoaglutinante (Gerlach 1994).

Su modo de transmisión es vertical a través del embrión y horizontal mediante todas las excreciones, aunque los títulos más elevados se encuentran en las heces. Por lo que la propagación por medio de fomites es muy importante (McFerran 2000).

Los Adenovirus del grupo II y III se encuentran relacionados con una enfermedad específica; mientras que los del grupo I su rol como patógeno es cuestionable (Hess 2000). El efecto patógeno sobre la salud de las aves ha demostrado que es un patógeno potencial y se relaciona con la producción de huevos (10% de descenso en producción de huevos), en la conversión de alimentos y crecimiento en la presentación de Hepatitis con Cuerpos de Inclusión, Síndrome de Hidropericardio, Enfermedades Respiratorias, Tenosinovitis en Pollos (McFerran 2000). En gansos y patos, se han aislados tres serotipos, pero que vía inoculación experimental no han reproducido la enfermedad en gansarones. En brotes con elevada mortalidad relacionada con hepatitis, se han observado partículas similares a Adenovirus en hígado. En patos almizcleros de 7 a 21 días de edad, se observó una traqueitis estenosante difteroide, con bronquitis y neumonía ocasional. Las células epiteliales de la tráquea contenían numerosos Adenovirus (McFerran 2000).

Varios Adenovirus serológicamente distintos se han recuperado de patos en cautiverio y de gansos de vida libre. Además, algunos virus aislados son serológicamente similares a los Adenovirus de gallinaceas que causan Síndrome de la Caída de la Postura. Durante un estudio anual en Europa se aisló mediante cultivos celulares de 45 patos, 10 gansos y 4 cisnes. (Ritchie y Kripcarter 1995).

En Francia se reportó un caso de patos criollo muertos por Adenovirus, los animales presentaron emaciación y comenzaron a morir a los 35 días de edad y la mortalidad alcanzó al 1,5% de la parvada. Por alrededor de 10 días, el virus se aisló mediante serología, algunos casos presentaron traqueitis diftérica y en otros bronquitis y neumonía (Gerlach 1994).En el mar Báltico, en el año 1998, se asoció la muerte de machos patos de eiders común *(Somateria mollissima)* con Adenovirus aislándose el virus de cloaca en 6 de10 animales, el virus se inoculó experimentalmente en patos (*Anas platyrhynchos*), quienes presentaron la misma signología que los eiders (impactación y necrosis del intestino), sin embargo sobrevivieron, por lo que se sugiere que la mortalidad se debió también a las condiciones de estres de la vida silvestre (Hollmen y col 2003 [a]). En el año 2000 en Alaska se produjo un brote de enfermedad y mortalidad de patos mavelda *(Clangula hyemalis)*; aislándose una cepa de Adenovirus proveniente de muestras de intestino. Esta cepa no pudo ser neutralizada con antisueros de referencia para grupos I, II y III (Hollmen y col 2003 [b]).

3.3.4. Virus Viruela aviar

Viruela aviar, causada por virus Pox es una enfermedad común de las aves domésticas y se ha informado que la padecen más de 60 especies de aves silvestres con distribución mundial. No tiene importancia para la salud humana y por lo general no afecta a mamíferos, sin embargo existe un reporte de un poxvirus aviar aislado en un rinoceronte. Cuando la enfermedad es leve, la mortalidad suele ser baja, pero cuando la infección es generalizada (forma diftérica) o cuando se complica con otras infecciones o condiciones ambientales deficientes la mortalidad es alta (Tripathy y Reed 2000).

Es una enfermedad muy difundida y ha sido reportada en la mayor parte del mundo (Gordon 1980).

Los virus Pox aviares, son miembros del género *Avipox* de la familia *Poxviridae* (Tripathy y Reed 2000), el virus es grande, oval, de 150 – 200 nm por 265- 350 nm, es un virus ADN revestido de una cubierta que se desarrolla en el citoplasma de las células infectadas, estas células tienen grandes inclusiones intracitoplasmáticas (cuerpos de Bollinger) (Karstad 1977).

El virus Pox afecta primariamente a la piel y mucosas, destruyendo las células y estimulando la producción de linfa. La lesión comienza como vesículas de distintos tamaños, que sobresalen de la superficie y se llenan de un fluido rico en virus, la vesícula estalla en la superficie y la piel sobre ella se vuelve amarilla y necrótica, la linfa forma una costra que se une a las contiguas formando una corteza, las bacterias pueden contaminar estas lesiones y provocar una descarga purulenta y aumentar la necrosis, (Arnall y Keymer 1975). La enfermedad puede presentar una forma diftérica que corresponde a lesiones fibronecróticas en las membranas mucosas, estas lesiones en boca, tráquea y esófago se caracterizan por la formación de laminas necróticas de células epiteliales, conocidas como membranas diftéricas. La mortalidad es baja cuando la enfermedad afecta sólo la piel (forma cutánea), en el caso de la forma diftérica las aves afectadas suelen morir, especialmente cuando estas lesiones se contaminan ya sea con hongos o bacterias; la presentación de la enfermedad puede ser con una o ambas formas combinadas; en este último caso se produce una septicemia con depresión

aguda, diseña, anorexia y muerte (Ritchie y Kripcarter 1995). Esta enfermedad rara vez se presenta en las aves acuáticas (Friend y Franson 1999).

La transmisión es través de aves infectadas en forma latente y de insectos artrópodos. En muchas áreas los mosquitos sirven como los vectores mecánicos, de diferentes formas ya sea al picar a un ave infectada en el momento de la viremia o al posarse sobre las lesiones cuando la vesícula se rompe (Friend y Franson 1999). La transmisión directa del virus entre aves está directamente ligada a lesiones en la piel (Gerlach 1994).

Esta enfermedad ha sido reportada en aproximadamente 9000 especies de aves diferentes; entre los que se encuentran aves de la familia anatidae como: ánades azulones *(Anas platyrhynchos)*, patos criollo, pato mandarín silbón europeo *(Mareca penélope)*, cerceta común *(Nettion creca)*, pato europeo *(Anas clypeata)* y negrón común *(Melanitta nigra)* (Bolte y col 1999).

En Michigan, Estados Unidos se han diagnosticado casos para el cisne trompetero infectados con virus Viruela aviar (Department of Natural Resources 2002).

Con relación a los antecedentes citados se formula la siguiente hipótesis:

3.4 HIPOTESIS DE TRABAJO

La muestra de la población de cisnes de cuello negro (*Cygnus melanocoryphus)*, obtenida del Sector San Ramón del Santuario de la Naturaleza "Carlos Anwandter", ha estado en contacto con virus Influenza Aviar, Newcastle, Adenovirus tipo I y/o Viruela.

3.5 OBJETIVOS

3.5.1 Objetivo General

Obtener información sobre la presencia de virus Influenza aviar, virus de la ENC, virus Viruela aviar y Adenovirus tipo I, en la población de cisnes de cuello negro (*Cygnus melancoryphus)* del Santuario de la Naturaleza "Carlos Anwandter", utilizando métodos de diagnóstico directos e indirectos.

3.5.2 Objetivos específicos

Pesquisar la presencia de virus de la ENC y virus Influenza aviar en la población de cisnes del Santuario de la Naturaleza mediante aislamiento del agente, utilizando las muestras cloacales y traquéales.

Determinar la presencia de anticuerpos para el virus de la Enfermedad de Newcastle mediante la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación (IHA), usando las muestras de suero.

Determinar la presencia de anticuerpos para virus Influenza aviar, Adenovirus tipo I y Viruela aviar, en la población de cisnes del Santuario de la Naturaleza, mediante inmunodifusión en gel agar, usando las muestras de suero.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Material Biológico

- 77 sueros de cisnes de cuello negro
- Suspensión al 10% en PBS de eritrocitos de pollo lavados
- Antígeno virus de la Enfermedad de Newcastle cepa La Sota
- Antígeno virus Influenza tipo A (reagents, NVSL)
- Suero positivo Influenza (reagents, NVLS)
- Antígeno Adenovirus tipo I (Universidad de Chile)
- Suero positivo Adenovirus tipo I (Universidad de Chile)
- Antígeno virus Viruela Aviar (Universidad de Chile)
- Suero positivo Viruela Aviar (Universidad de Chile)
- Suero control negativo libre de patógenos específicos (SPF) (Universidad Austral de Chile)
- Huevos embrionados SPF (Universidad Austral de Chile, UACH)

4.1.2 Material de laboratorio

- Cámara de flujo laminar. Haroshet®
- Microplacas: Para IHA. Brand®
- Medio de cultivo con antibiótico (Caldo peptona con 10.000U.I/ml de penicilina y 0, 25 mg/ml de gentamicina)
- Micropipeta multicanal: Transferpette®-8.Brand®
- Tubos Ependorff
- Refrigerador
- Incubadora
- Jeringas de tuberculina
- Agujas de 26 ½ G
- Ovoscopio
- Puntas para micropipetas 2-200ul.Brand®
- Pipeta de repetición: Finnpipette®. Labsystem®
- Puntas pipeta repetición: Finntip 2,5 ml. Labsystem®
- Placas petri

- Gel Agar (fosfato disódico, fosfato potásico, agar noble, azida de sodio, cloruro de sodio y agua destilada)
- Sacabocados

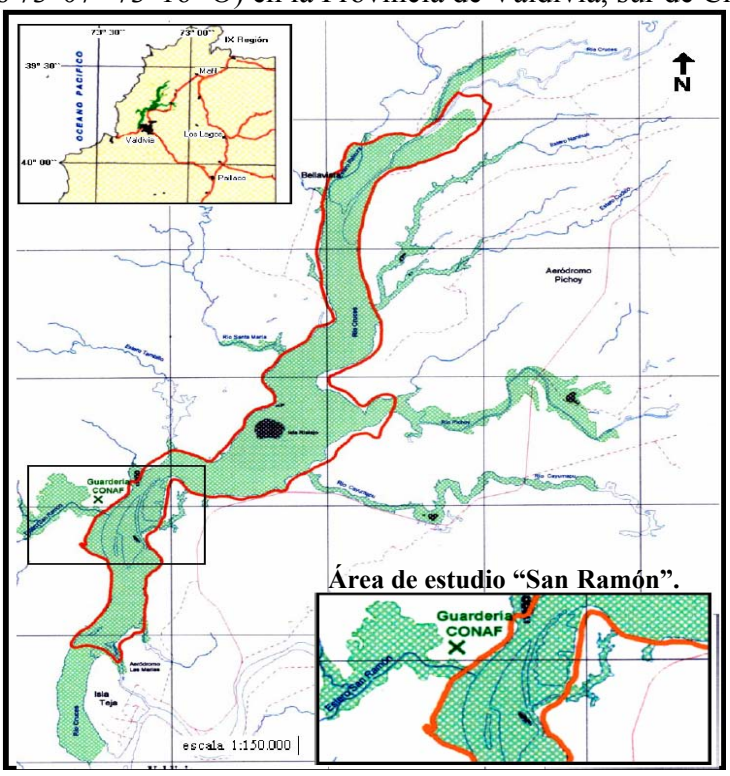
4.2 MÉTODOS

4.2.1 Diseño del estudio

Determinación de la presencia y/o ausencia de los agentes virales de la ENC, Influenza aviar, Adenovirus tipo I y virus Viruela aviar, utilizando métodos de diagnóstico directos e indirectos, en la muestra de cisnes de cuello negro *Cygnus Melanocoryphus*.

4.2.2 Área estudio

El estudio se realizó en el Santuario de la Naturaleza e Investigación Científica "Carlos Anwandter", Río Cruces, sector de San Ramón. Ubicado en la Región de Los Lagos (39°35'-39°47' S y los 73°07'-73°16' O) en la Provincia de Valdivia, sur de Chile (figura 2)



Fuente: Chile, 1999.

Figura 2. Mapa del Santuario de la Naturaleza y área de estudio.

4.2.3 Determinación del tamaño muestral y periodo de muestreo.

El tamaño muestral se obtuvo mediante el programa computacional EPIINFO 6.04; determinándose 70 cisnes como muestra, considerando una población de 600 cisnes, una prevalencia esperada de 50%, un error de un 11% y un coeficiente de confianza de un 95%, a este número se le agregó un 10% más para considerar las pérdidas, por lo que el tamaño muestral se determinó en 77 cisnes.

Debido a reducción drástica de la población de cisnes este tamaño muestra se obtuvo entre los meses de Octubre del 2004 y Febrero del 2005 (Anexo 1).

4.2.2 Captura de ejemplares y obtención de muestras

Se utilizó un bote a motor y con la ayuda de los guardafaunas del sector fueron capturados los ejemplares mediante el uso de una vara de dos metros con un aro metálico en un extremo provisto de una red (chinguillo). Las aves fueron llevadas a tierra para la toma de muestras. Esta captura fue autorizada por el Servicio Agrícola Ganadero (SAG) (Anexo 7). De estas aves se obtuvieron tórulas traqueales y cloacales, que se transportaron al Laboratorio de Patología Aviar de la UACH, en tubos con medio de cultivo con antibióticos, asegurando la inmersión completa de la tórula en el medio. Además, se obtuvo sangre entera mediante venopunción de la vena braquial en el ala para obtención de suero (Figura 3). Los cisnes fueron identificados mediante un anillo en la extremidad inferior, posteriormente se pesaron, sexaron y fueron liberadas en los sitios de colecta en un plazo no mayor a una hora. Las muestras fueron identificadas y transportadas a una temperatura aproximada de 4°C.

Fuente: Lumeij 1996

Figura 3. Punción de la vena braquial de un ejemplar de cisne de cuello negro muestreado.

Pesquisa del agente viral

4.2.2.1 Aislamiento viral

Mediante la adición de 1 ml. de la suspensión de 5 tórulas traqueales, se obtuvo un inóculo, siguiendo el mismo procedimiento con las tórulas cloacales. Estos inóculos se congelaron y descongelaron (tres veces) y se centrifugaron para obtener el sobrenadante, el cual se inoculó en 5 huevos SPF, de 8-9 días de incubación en un volumen de 0,2 ml. Por huevo, vía saco alantoídeo. Estos huevos se incubaron 37° C por 7 días. Embriones muertos a las 24 hrs. se eliminaron por ser considerada mortalidad inespecífica. Líquido alantoídeo se obtuvo 4-7 días postinoculación, previo enfriamiento de los huevos a 4°C y se realizó la prueba de aglutinación rápida en placa utilizando una suspensión de glóbulos rojos al 10% lavados con PBS (Beard 1980).

Una muestra se consideró negativa si posterior a tres pasajes en los huevos embrionados no se observó actividad viral.

4.2.3.2 Pesquisa de anticuerpos

4.2.3.2.1 Determinación de anticuerpos para la ENC (paramixovirus I)mediante la prueba de IHA: Se realizó un test de microaglutinación (Beard 1980) para detectar anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación, utilizándose 4 unidades hemoaglutinantes (UHA) del antígeno y una suspensión de eritrocitos lavados de pollo diluido al 1%.

Los títulos se expresaron como el valor recíproco de la mayor dilución del suero problema capaz de inhibir la hemoaglutinación. Para la validación de este test se usó como control suero positivo a virus de la ENC y un suero negativos SPF.

4.2.3.2.2 Determinación de anticuerpos para Adenovirus tipo I, virus Viruela aviar e Influenza aviar mediante inmunodifusión en gel agar: La prueba de inmunodifusión en gel agar para Influenza aviar se realizó en el Laboratorio Central del SAG según el método de Shafer (2003). La forma en que se distribuyeron los reaccionantes en el agar se muestra en la Figura 4:

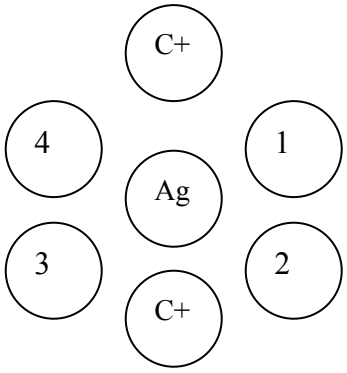


Figura 4. Distribución de reaccionantes en cada roseta: Ag.: Antígeno Influenza AIID (reagents, NVSL); C+: Suero control positivo influenza AIID (reagents, NVLS); 1,2,3,4: sueros problema.

Previo a la lectura, las placas se incubaron a 37°C en ambiente húmedo por 24 hrs.

El análisis de anticuerpos para Adenovirus tipo I y virus Viruela aviar se realizó en el Laboratorio de Patología aviar de la Universidad de Chile, utilizando reaccionantes elaborados en este laboratorio.

En la preparación del antígeno para Adenovirus tipo I se utilizó una mezcla de dos cepas del virus Adeno del tipo I. Una cepa perteneciente al serotipo 4, aislado de un caso de Hepatitis a Cuerpo Inclusión (HCI) y una cepa del serotipo 1, CELO, proveniente de Laboratorio de Virología del SAG.

Los sueros control positivo provenían de pollos Leghorn de 6 semanas de edad vacunados con vacuna inactivada inactivada, emulsionada en aceite contra virus HCI, serotipo 4, Grupo I (Investigación aplicada SA de CV®, México) y pollos inoculados con una suspensión de virus Celo (0.4 ml intra venoso) (González 2005).

El antígeno virus Viruela aviar, fue elaborado mezclando partes iguales dos aislados del virus obtenidos de homogeneizados de membrana corio alantoídeas (MCA)(González 2005).

El suero control positivo se obtuvo de pollos broiler, que habían recibido tres dosis de vacuna virus Viruela modificado (Pox Diftosec, Rhone Merieux®)., aplicadas semanalmente, mediante el método de estilete en la membrana del ala (González 2005). El suero control negativo se obtuvo de gallinas SPF del plantel de la Universidad Austral de Chile (UACH).

La forma en que se distribuyen los reaccionantes en la prueba de inmunodifusión para adenovirus tipo I y Viruela aviar se presenta en la Figura 5.

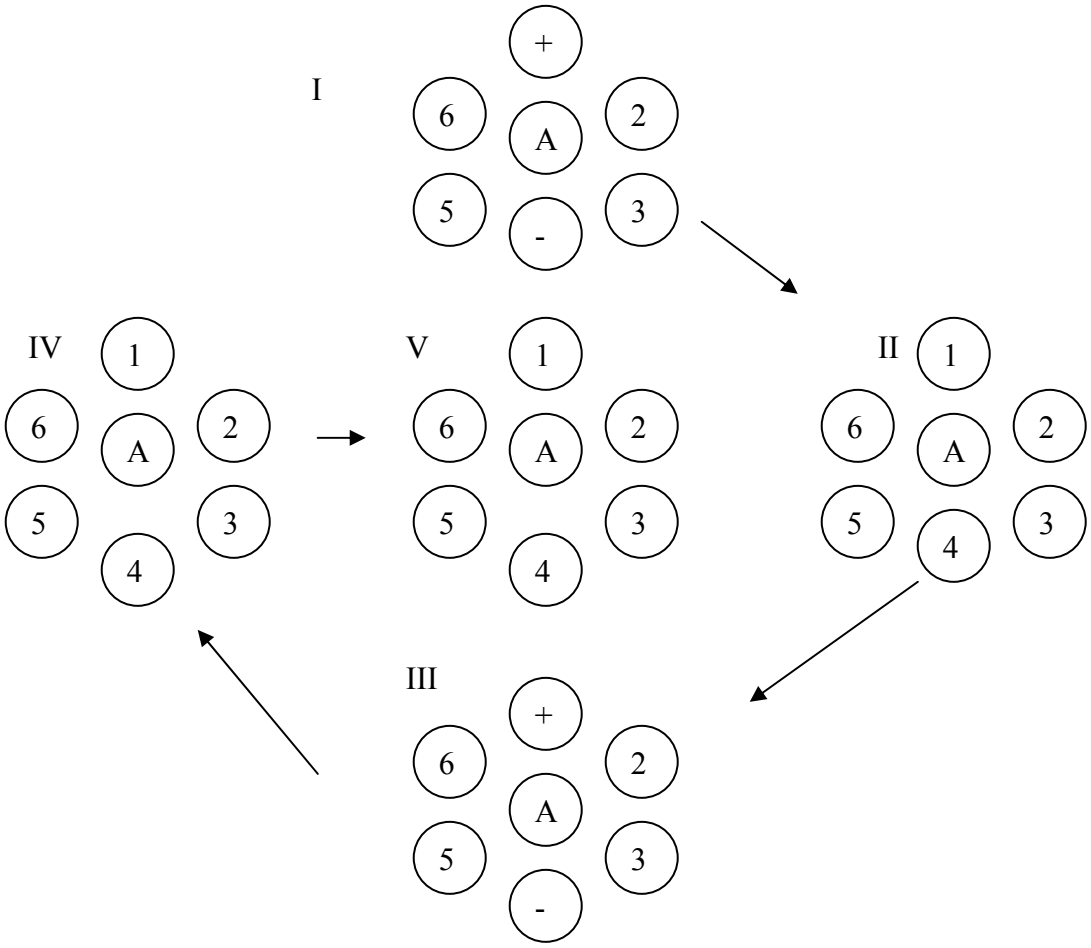


Figura 5. Distribución de sueros y anticuerpos virales en rosetas de una placa petri para inmunodifusión: + (suero control positivo); - (Suero control negativo); 1,2,3,4,5,6 (sueros problemas); I, II, III, IV, V (N° de cada roseta). Las flechas indican el orden en que se realizó la lectura.

En el caso de adenovirus se utilizaron dos sueros controles positivos; el primero (anti-CELO) se puso en la roseta I en el pocillo 1, el segundo (anti-Hepatitis a Cuerpos de inclusión serotipo 4, GrupoI) en la roseta III (Beard 1980).

Las placas se incubaron en un ambiente húmedo a temperatura ambiente. La lectura se realizó a las 24 y 48 hrs (Tripathy y Hanson 1980).

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERIZACIÓN DE LA MUESTRA

El 92% (71) de los cisnes muestreados fueron adultos (machos 94,1%, hembras 88,5%), predominado en el total de la muestra los machos con un 66.2% (51/77) (tabla 3).

Tabla 3. Edad y sexo de los cisnes muestreados entre Octubre del 2004 a Marzo del 2005 en el Sector San Ramón del Santuario de la Naturaleza "Carlos Anwandter" .

	Machos 66,2% (51/77)		Hembras 33,7% (26/77)	
	Adultos	Jóvenes	Adultas	Jóvenes
Porcentaje	94.1(48 /51)	5.9 (3/51)	88.5 (23 /26)	11.5 (3 /26)

Los pesos de los cisnes fluctuaron entre 3,0 y 6,5 kg siendo el peso promedio de 4,7 kg. Los machos adultos presentaron pesos promedios superiores a las hembras, 5,0 kg y 4,1 kg respectivamente (tabla 4).

Tabla 4. Peso de los cisnes muestreados, según sexo y edad entre Octubre del 2004 a Marzo del 2005 en el Sector San Ramón del Santuario de la Naturaleza "Carlos Anwandter" (Anexo 3).

	Machos n=51		Hembras n=26	
	Adultos Media ± Ds	Jóvenes Media ± Ds	Adultas Media ± Ds	Jóvenes Media ± Ds
Peso (kg)	5,0±0,9	4,2±0,8	4,1±0,9	3,8±0,9

Como hallazgo, se debe destacar que 45 de los cisnes muestreados presentaron lesiones circulares amarillentas y solevantadas en las membranas interdigitales de las patas.

5.2 AISLAMIENTO VIRAL

Al realizar aislamiento vírico mediante inoculación en huevos embrionados, no se detectó la presencia de los virus de Influenza aviar y virus ENC.

5.3 SEROLOGÍA

5.3.1 Inhibición de la hemoaglutinación

Si bien no se logro aislar el virus de la Enfermedad de Newcastle (ENC), sí se detecto la presencia de anticuerpos por el test de Inhibición de la Hemoaglutinación , con un 42,85% (n=33) de seroprevalencia. Los títulos fluctuaron entre 4 y 256, siendo el titulo mas frecuente 16 (figura 7).

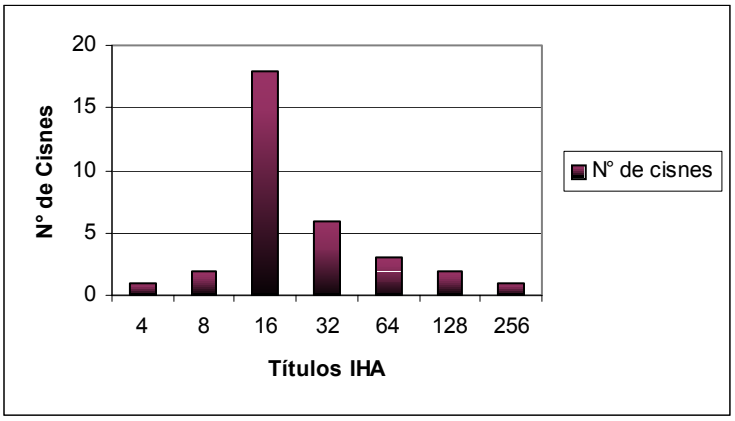


Figura 7. Distribución de títulos de anticuerpos positivos al test de IHA, de los sueros de los cisnes muestreados entre Octubre del 2004 a Marzo del 2005 en el Sector San Ramón del Santuario de la Naturaleza "Carlos Anwandter".

Al estudiar la seroprevalencia a ENC, según edad y sexo, como tasa cruda y específica (Anexo 5), se encontró que del total de los individuos seropositivos el 96,9% correspondían a individuos adultos. Al analizar toda la población fueron los machos adultos los que presentaron mayor porcentaje de seropositividad 28,5%, seguido de las hembras adultas con un 12,9% y 1,3% de hembras juveniles. En cambio al analizar las tasas específicas, del total de machos adultos muestreados el 46% fue seropositivo y de las hembras adultas un 43% (tabla 5).

Tabla 5. Seroprevalencia del virus de la Enfermedad de Newcastle (tasa cruda y específica), por sexo y edad de los cisnes muestreados entre Octubre del 2004 a Marzo del 2005 en el Sector San Ramón en el Santuario de la Naturaleza "Carlos Anwandter".

Agente Viral	Machos		Hembras	
	Adultos	Juveniles	Adultas	Juveniles
Tasa cruda a ENC	28,5% (22/77)	0% (0/77)	12,9% (10/77)	1,3% (1/77)
Tasa específica a ENC	46% (22/48)	0% (0/3)	43% (10/23)	33% (1/3)

( ): muestras positiva/n

5.3.2 Inmunodifusión en gel agar

En la tabla 6 se presentan los resultados de la prueba de Inmunodifusión en gel agar para virus Influenza aviar, Adenovirus tipo I y virus Viruela aviar, encontrándose sueros reaccionantes sólo para Adenovirus con una seroprevalencia de un 22,02%.

Tabla 6. Número y seroprevalencia de sueros de cisne de cuello negro *(Cygnus melancoryphus)* muestreados entre Octubre del 2004 a Marzo del 2005 en el Sector San Ramón del Santuario de la Naturaleza "Carlos Anwandter" reaccionantes en la prueba de Inmunodifusión en gel agar para Adenovirus tipo I, virus Viruela aviar e Influenza aviar.

Agente	n° positivos	% positivos
Adenovirus tipo I	17/77	22,02
Virus Viruela aviar	0/77	0
Virus Influenza aviar	0/77	0

De total de individuos seropositivos a Adenovirus tipo I, el 19,4% (15) fueron cisnes adultos. De la población total fueron los machos los que presentaron una mayor seroprevalencia (16,8%) con respecto a las hembras (6,4%). En cambio al analizar las tasas específicas del total de machos muestreados adultos el 22,9% fue seropositivo y de las hembras adultas un 21% (tabla 7).

Tabla 7. Seroprevalencia de virus de la ENC y Adenovirus tipo I, por sexo y edad de los cisnes muestreados entre Octubre del 2004 a Marzo del 2005 en el Sector San Ramón en el Santuario de la Naturaleza "Carlos Anwandter".

Agente Viral	Machos		Hembras	
	Adultos	Juveniles	Adultas	Juveniles
Tasa cruda para Adenovirus tipo I	14,2% (11/77)	2,6%(2/77)	6,4% (4/77)	0% (0/77)
Tasa específica para Adenovirus tipo I	22,9% (11/48)	66% (2/3)	21% (5/23)	0% (0/3)

( ): muestras positiva/n

6. DISCUSIÓN

Los pesos de los cisnes muestreados fluctuaron entre 3,0 y 6,5 kg con un promedio de 4,7 (ver tabla 4); estudios realizados en forma paralela a esta investigación indican que estos pesos evidencian un estado de desnutrición, además, describen la presencia de una leucopenia en la población de cisnes del Santuario de la Naturaleza (Artacho y col 2005, Chile 2005 [a], Néspolo y col 2005, Soto-Gamboa y col 2005). El hallazgos de lesiones amarillentas solevantadas en las membranas interdigitales de las extremidades inferiores en 45 ejemplares, permiten afirmar que las aves de la muestra provenían de una población de cisnes con alteraciones clínicas.

Los resultados obtenidos, confirman parcialmente la hipótesis de trabajo debido a que se determinó la presencia de anticuerpos sólo para Adenovirus tipo I y virus de la ENC.

En el caso de virus Viruela aviar, en que no se comprobó la presencia de anticuerpos, la literatura señala que aves acuáticas rara vez presentan la enfermedad (Friend y Franson 1999), además se debe tener presente que la técnica diagnóstica de inmunodifusión no es una prueba lo suficientemente sensible (Tripathy y Reed 2003).

Los resultados negativos en la prueba de inmunodifusión para virus Influenza aviar, indicarían la ausencia de anticuerpos en los individuos muestreados, sin embargo, la literatura cuestiona el uso de antígeno viral proveniente de gallina, en el diagnóstico en aves acuáticas. Al respecto Slemons y Easterday (1972) señalan que la respuesta al antígeno de virus influenza en la prueba de inmunodifusión, es generalmente de gran magnitud en faisanes y pavos, pero no se ha detectado en patos posterior a la infección. De igual modo, Senne (2003) señala que esta prueba no es confiable para evaluar la infección en aves acuáticas y que además este test es relativamente insensible con respecto a otros (Ritchie y Kripcarter 1995). Estos antecedentes plantean la necesidad de utilizar antígenos específicos para aves acuáticas. Alvarado (2004), en un estudio similar, encontró un cisne positivo a esta prueba, usando una muestra de 52 sueros de cisne de cuello negro muestreados entre Junio y Septiembre del 2003, provenientes del sector “San Ramón”, del Santuario de la Naturaleza “Carlos Anwandter”, en este trabajo no se realizó aislamiento viral por lo que este resultado no pudo ser confirmado.

La presencia de anticuerpos para Adenovirus tipo I en el grupo de cisnes muestreados podría tener su origen en la ubicuidad del virus, que es considerado oportunista y que normalmente produce cuadros clínicos en aves inmunodeprimidas (McFerran 2000). En los cisnes muestreados se observó un evidente estado de desnutrición debido a la falta de alimentación, situación señalada en un informe elaborado por la UACH, en una investigación realizada entre Noviembre del 2004 y Marzo del 2005, determinando las causas de la disminución de la avifauna del santuario (Chile 2005 [a], Artacho y col 2005, Soto-Gamboa y col 2005), señalan que existió un deterioro fisiológico importante, detectándose hasta un 30%

de pérdida de masa total además Néspolo y col (2005) señalan que además estos cisnes presentaba una leucopenia, lo que es aun más sugerente de una inmunodepresión.

La presencia de anticuerpos indicaría que las aves en algún momento estuvieron en contacto con el virus, sin embargo no fue posible aislarlo y determinar el patotipo del virus que estuvo en contacto con las aves (Gordon 1980). Alvarado (2004) en un trabajo similar, no encontró anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación contra virus de la ENC utilizando una muestra de 52 sueros de cisne de cuello negro muestreados entre Junio y Septiembre del 2003 provenientes del sector "San Ramón", del Santuario de la Naturaleza "Carlos Anwandter". Esto sugiere un posible contacto con el virus de la ENC posterior al año 2003. Se postula que esta seroconversión podría haberse originado por infección con cepas lentogénicas, debido a la presencia en las cercanías del santuario (Pechulquín) de un plantel de ponedoras de producción intensiva, donde se vacuna contra esta enfermedad; por lo que es posible haya ocurrido un contacto directo o indirecto. Sin embargo, la literatura señala que las cepas vacunales lentogénicas se transmiten de aves vacunadas a otras susceptibles sólo por contacto directo (Acha y Szyfres 2003). Por otra parte, en los ejemplares muestreados no se observó signología que indicara un posible cuadro clínico de la enfermedad. En relación a la presentación de la enfermedad en cisnes, no se encontró antecedentes en la literatura revisada.

Otra posible explicación, del origen de la infección, estaría en la dispersión y nomadismo del cisne (Schlatter y col 2002), el cual puede desplazarse dentro o fuera del país estableciendo contacto con otras especies de aves migratorias.

Se debe además tener en cuenta la gran cantidad de aves migratorias que visitan el Santuario de la Naturaleza, unas de origen neártico como Playeros *(Calidris sp)*, pollitos de mar *(Phalaropus sp y Steganopus sp)*, chorlos *(Pluvialis sp),* Gaviota de Franklin *(Larus pipixcan),* pitotoi grande *(Tringa melanoleuca)*, pitotoi chico *(Tringa flavipes)*, zarapito *(Munenius phaeopus)*, zarapito de pico recto *(Limora haemartica)* y águila pescadora *(Pandion haliaetus)*(*) y otras especies nomádicas (movimientos dispersivos entre Argentina, Uruguay, sur de Brasil y Chile) como el cisne coscoroba *(Coscoroba coscoroba)*, Flamenco chileno *(Phoenicopterus chilensis)*, Cormorán yeco *(Phalacrocorax brasilianus)*, Cuervo del Pantano *(Plegadis chihi)*, patos *(Anas sp)* y gansos *(Netta sp y Oxyura sp)* (Schlatter y col 2002), cualquiera de estas aves podría ser portadora de alguna enfermedad exótica para nuestro país, por lo que se debe resaltar la importancia epidemiológica que tiene el Santuario de la Naturaleza.

De los resultados obtenidos se puede concluir que los cisnes muestreados estuvieron expuestos a Adenovirus tipo I y virus de la ENC.

(*): Comunicación personal Dr. Roberto Schlatter Instituto de Zoología de la Universidad Austral de Chile

7. BIBLIOGRAFÍA

Acha P y Szyfres B. 1977. *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales.* Organización Panamericana de la Salud. Washington, D.C. 20037, E.U.A.

Acha P y Szyfres B.2003. Enfermedad de Newcastle En: *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales.* Pp 168-175 3ª edición Organización Panamericana de la Salud. Washington, D.C. 20037, E.U.A.

Aldous E y Alexander D. 2001. Detection and diferentation of Newcastle disease virus (avian paramixovirus type 1). *Avian Pathol* 30 (2) 117-128.

Alexander D 2000 [a]. Enfermedades de Newcastle y otros paramixovirus aviares, *Rev sci tech Off int Epiz* 19; 443-462.

Alexander D 2000 [b]. Enfermedades de Newcastle y otras Infecciones por *Paramyxoviridae*. En: Calnek, B (eds). *Enfermedades de las aves*. Pp 555-577 2ª ed. Ed. El mundo moderno, México Df.

Alvarado L. 2003. Prospección de enfermedades virales, *Mycoplasma gallisepticum* y *Salmonella sp***.** En cisnes de cuello negro (*Cygnus melancoryphus*, Molina 1782) en el Santuario de la Naturaleza "Río Cruces", Valdivia. *Memoria de Título*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.

Alvarado M 2005. Descripción de la Patología "Alas de Ángel" en Cisne de Cuello Negro (*Cygnus melancoryphus*, Molina 1782), en el Santuario de la Naturaleza e Investigación Científica Carlos Anwandter, Valdivia, Chile. *Memoria de Título*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.

Araya B y Millie H. 1986. *Guía de Campo de las Aves de Chile*. 6ª ed. Ed. Universitaria. Santiago de Chile.

Arnall L y Keymer I. 1975. *Bird Diseases*. Ed. T.F.H. Publications, Estados Unidos.

Barbier B, Acreman M y Knowler D.1997. *Valoración económica de los Humedales, Guía para decisores y planificadores*. Oficina de la Convención Ramsar. Universidad de York. Instituto de Hidrología, UICN- Unión Mundial para la Naturaleza.

Beard C W 1980. Serologic procedures. En: Purchase H. G. (eds). *In A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens*. Pp 129-135 1ª ed Ed. Kennett Square, PA: American Association Avian Pathologists.

Birkhead M y Perrins C. 1986. *The Mute Swan* .Croom Helm, London..157 p.

Blake E. 1977. *Manual of Neotropical Birds*. Volumen 1. The University of Chicago Press, Chicago.

Boettcher A. 2004. Valores Bioquímicos Sanguíneos del Cisne de Cuello Negro (*Cygnus melancoryphus***,** Molina 1782), en una Población Silvestre, de Valdivia, Chile. *Memoria de Título*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.

Bolte A, Meurer J, Kaleta E. 1999. Avian host spectrum of avipoxviruses. *Avian Pathol* 28 415-432.

Capua I y Mutinelli F.2001. Mortality in Muscovy ducks (*Cairina moschata*) and domestic geese (*Anser anser var. domestica*) associated with natural infection with a highly pathogenic avian influenza virus of H7N1 subtype. *Avian Pathol* 30 (2) 179-183.

Carry J y Cross C.1991. Newcastle Disease. En: Cross, C y Rosskopf, W (eds). *The Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice*. Vol 21 N°6.

Chile 1999. Ministerio de Agricultura. Corporación Nacional Forestal,CONAF. *Plan de Manejo Reserva Nacional Río Cruces*. Documento de Trabajo Nº 325.

Chile 2000. Ministerio de Agricultura, CONAF Cunazza, C *Censos de especies de fauna 1995-1999. Censos de áreas de concentración de fauna 1995-1999: listado de vertebrados terrestres y dulceacuícolas de Chile y su distribución regionalizada*. Ed. CONAF, Santiago.

Chile 2002. Ministerio de Agricultura; SAG. Disponible en: http://www.sag.cl/framearea.asp?cod=12 Consultado: 18-01-2005.

Chile 2005 [a]. Corporación Nacional del Medio Ambiente y Universidad Austral de Chile. *Estudio sobre origen de mortalidades y disminución de población de aves acuáticas en el santuario de la Naturaleza Carlos Anwandter, en la provincia de Valdivia.* Disponible en: http://www.conama.cl/portal/1255/article-31832.html. Consultado el: 12-10-2005.

Chile 2005 [b]. Ministerio de Vivienda y Urbanismo, Jardín Zoológico Nacional. 2004. Disponible en: http://www.zoologico.cl/modules.php?name=Content&pa=showpage&pid=40 Consultado: 03-01-2005.

Chile 2005 [c]. Servicio Agrícola Ganadero. SAG. Disponible en: http://www.sag.gob.cl/pls/portal/docs/page/pg_sag_biblioteca/bibl_sanidad/bibli_sananimal/biblio_sanani_listas/situacion_sanitaria_chile_I_semestre_2005.pdf Consultado el : 12-10-2005.

Cites 2005. Convención sobre el Comercio Internacional de Flora y Fauna Silvestres. 2005. Disponible en: http://www.cites.org/esp/append/appendices.shtml. Consultado el: 18-01-2005.

Cortés J. 2002. Influenza Aviar: Aspectos Epidemiológicos y Económicos. *Monografías Med Vet* 22 (1) 11-20.

Corti P. 1996. Conducta de alimentación y capacidad de forrajeo del Cisne de Cuello Negro (*Cygnus melancoryphus* Molina , 1782) en Humedales de Valdivia. *Tesis de pregrado*, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Austral de Chile. Valdivia, Chile.

Corti P y Schlatter R. 2002. Feeding Ecology of the Black-necked Swan *Cygnus melancoryphus* in Two Wetlands of Southern Chile. *Studies on Neotropical Fauna and Enviroment* 37 (1) 9-14.

Department of Natural Resources. 2002. Avian Pox. En: *Michigan Wildlife Disease Manual*. Disponible en: http://www.michigan.gov/dnr/0,1607,7-153-10370_12150_12220-26362--,00.html. Consultado el : 2-04-2006.

Di Marzio W y McInnes R. 2005. *Misión Consultiva Ramsar: Chile (2005) Informe de Misión Santuario Carlos Anwandter (Río Cruces), Chile*. Corporación Nacional del Medio Ambiente; CONAMA. Disponible en: http://www.conama.cl/portal/1255/article-31988.html. Consultado el: 12-10-2005.

De Marco M, Foni G, Barigazzi G, Campitelli L, Di Traini L, Delogu M, Donatelli I, Guberti V, Raffini E. 2003. Circulation of Influenza Viruses in Wild Waterfowl Wintering in Italy During the 1993-99 Period: Evidence of virus Shedding and seroconversion in Wild Ducks. *Avian Dis* 47 861-866.

Do Nascimiento J, Flores J, Ataligue B, Scherer S y dos Santos P.2001. Biological aspects of the Black.necked Swan *(Cygnus melancoryphus)* and Coscoroba Swan *(Coscoroba coscoroba)* in rio Grande do Sul state, Brazil. *Melopsittacus* 4 (1) 31-38.

Easterday, B, Virginia S, Hinshaw y Halvorson D 2000. Influenza. En: Calnek, B (eds). *Enfermedades de las aves*. Pp 597-614 2° ed. Ed. El mundo moderno, México Df.

Espejo M. 2005. Los Riñones del Planeta. *Chile Forestal*. 309 1.

Friend M y Trainer D. 1970. Serologic Evidence of Newcastle Disease In Captive Mallards and Swans*. *J Wildl Dis* 6 130-134.

Friend M y Franson C. 1999. Viral Diseases. En: Ciganovich E, Redman P y Stenback R (eds).1999. *Field Manual of Wildlife Diseases General Field Procedures and Diseases of Birds*. Pp 163-169 Ed. Biological Resources Division National Wildlife Health Center 6006 Schroeder Road Madison, WI 53711 U.S.A.

Gerlach H. 1994.Viruses. En: Ritchie, H y Harrison (eds).1994.*Avian Medicine: Principles and Aplication*.Pp 865-928 Ed. Harrisons.

González G. 2005. Estudio Serológico de Chlamydophila Psittaci, *Salmonella* spp, Virus Pox Aviar, Adenovirus y Virus Polioma en aves del Orden Psittaciforme en Cautiverio en Chile Central. *Memoria de Título* Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile.

Gordon R. 1980.En: Gordon R F (Ed) *Enfermedades de las aves*. 1ª ed Ed. El Mundo Moderno, SA.

Hanson B, Stallknecht E, Lewis L, Senned D, Swayne D.2003. Avian Influenza Viruses in Minnesota Ducks During 1998–2000. *Avian Dis* 47 867-871.

Hess M. 2000. Detection and differentiation of avian adenoviruses. *Avian Pathol* 29, 195–206.

Hollmen [a] T, Franson C, Docherty D, Myllys V, Kilpi M..2003. An adenovirus associated with Intestinal Impaction and mortality of male eiders (*Somateria mollissima*) in the Baltic sea. *J Wildl Dis* 39 (1) 114-120.

Hollmen [b] T, Franson C, Docherty D, Flint P, Grand R, Lanctot R, Wilson H.. 2003. An Adenovirus linked to mortality and disease in Long-Tailed Ducks *(Clangula hyemalis)* in Alaska. *Avian Dis* 47 1437-1440.

Hulse-Post D, Sturm-Ramirez K, Buranathai C, Chen H, Ellis T, Guan Y, Govorkova A, Humberd J, Krauss S, Long H, Naipospos T, Nguyen T, Peiris J, Puthavathana P, Scholtissek C, Seiler P, Webster R. 2005. Role of domestic ducks in the propagation and biological evolution of highly pathogenic H5N1 influenza viruses in Asia. *PNAS* 102 (30), 10682-10687.

Jones Y y Swayne D.2004. Comparative Pathobiology of Low and High Pathogenicity H7N3 Chilean Avian Influenza Viruses in Chickens. *Avian Dis* 48:119–128.

Karstad L 1977. Viruela. En: Anderson, R Davis, J Karstad, L y Trainer, D. (eds). *Enfermedades infecciosas y parasitarias de las aves silvestres*. Pp 34-41. Ed. Acribia, España.

Karunkaran D, Hinshaw V, Halvorson D, Newman J, Poss P. 1983. Influenza A Outbreaks in Minnesota Turkeys Due to Subtype H10N7 and Possible Transmision by Waterfowl. *Avian Dis* 27 (2) 357-366.

Lumeij J. 1996. Biochemistry and Sampling. En: Peter B, Forbes N, Harcourt Brown N (eds). *Manual of Raptors, Pigeons and Waterfowl*. Pp 63-68 Ed. British Small Animal Veterinary Association Limited England.

McFerran J 2000. Infecciones por Adenovirus. En: Calnek, B (eds).2000. *Enfermedades de las aves*. Pp 621-631 2 [a] ed. Ed. El mundo moderno, México Df.

Néspolo R, P. Artacho, Castañeda EL, Soto-Gamboa M, Verdugo C, "Haematological parameters as tools for evaluating physiological status in an endangered Black – Necked Swan population. Integrative and Comparative Biology 45 (6): 1106.

Olsen 1994.Anseriformes. En: Ritchie, H y Harrison (eds).1994. *Avian Medicine: Principles and Aplication*.Pp 1238-1274 Ed. Harrisons.

OIE 2004. Boletín Epidemiológico, Vol. 25 N° 1, marzo 2004. Disponible en: http://www.paho.org/spanish/dd/ais/be_v25n1-influeza.htm. Consultado: 04-01-2005.

OIE 2005. Clasificación de enfermedades de declaración obligatoria a la OIE. Disponible en: http://www.oie.int/esp/maladies/es_classification.htm. Consultado: 18-05-2005.

Palmer, E y Trainer D.1977.Enfermedad de Newcastle. En: Anderson, R Davis, J Karstad, L y Trainer, D (eds). *Enfermedades infecciosas y parasitarias de las aves silvestres*. Ed. Acribia, España.

Ritchie, B y Kripcarter, C.1995. *Avian Viruses*, *Function and Control*. Ed. Wingers Publishing, Florida.

Salazar J.1988. Censo poblacional del cisne de cuello negro (*Cygnus melancryphus*) en Valdivia. III Simposio de Vida Silvestre. *Medio Ambiente* 9 (1) 78-87.

Schelling E, Thür B, Audigé L, Griot C.1999. Epidemiological study of Newcastle disease in backyard poultry and wild bird populations in Switzerland. *Avian Pathol* 28 263-272.

Schlatter R, Salazar J, Villa A y Meza J. 1991. Demography of Black- necked Swans *Cygnus melancryphus* in three Chilean wetland areas. En: Sears J y Bacon P.(Eds.). Proceedings Third IWRB International Swan Symposium, Oxford 1989. *Wildfowl*, Supplement 1.

Schlatter R, Corti P, Miranda L, Rosas R, Simeone A, Thon L. 1997. La Recuperación Natural de una Especie Amenazada en Chile: Evidencias Demográficas con el Cisne de Cuello

Negro *(Cygnus melancoryphus)* en el Sitio Ramsar del rio Cruces, Valdivia. *III Congreso Chileno de Ornitología y V Encuentro Nacional de Ornitólogos,* Santiago, pp. 6.

Schlatter R, Navarro R y Corti P. 2002. Effects of El Niño Southern Oscillation on Numbers of Black-necked Swans at Río Cruces Sanctuary, Chile. En: Rees E, Earnst S. y Coulson J (Eds.). Proceedings of the Fourth International Swan Symposium 2001. *Waterbirds* 25: Special Publication (1) 114-122.

Senne D. 2003. Avian Influenza in the Western Hemisphere Including the Pacific Islands and Australia. *Avian Dis* 47 198-805.

Sharp G, Kawaoka Y, Bean W, Hinshaw V, Jones D, Pryor S, Webster R.1997. Coinfection of Wild Ducks by Influenza A Viruses: Distribution Patterns and Biological Significance. *J Virol* 71 (8) 6128–6135.

Shafer A. 2003. Avian Influenza Agar gel Inmunodiffusion Test to Detect Serum Antibodies to Type A Influenza Viruses. En: United States Department of Agriculture Animal and plant health Inspection Services. (Eds.) *Center for veterinary Biologics and National Veterinary Services Laboratories testing Protocol*. P.O. Box 844.

Slemons R y Easterday B. 1972. Host response differences among 5 avian species to an influenzavirus –turkey/Ontario/7732/66 (Hav5N?)*. *Bull Wld Hlth Org.* 47 521-525.

Slemons R, Hansen W, Converse K, Senne D. 2003.Type A Influenza virus Surveillance in Free-Flying, Nonmigratory Ducks Residing on the Eastern Shore of Maryland. *Avian Dis* 47 1107-1110.

Soto-Gamboa M, Artacho P, Castañeda L, Néspolo R y Verdugo C. 2005. Fisiología Ecológica y Conservación Biológica: Deterioro Fisiológico del Cisne de Cuello Negro *(Cygnus melnacoryphus)* en el Santuario de la Naturaleza Carlos Anwandter. *Actas del VIII Congreso Chileno de Ornitología 19 al 22 de Octubre 2005 Chillán.*Pp. 5.

Swayne D y King D.2003. Avian influenza and Newcastle disease. *JAVMA* 222 (11) 1534-1539.

Thornley M.1004. Avian influenza ravages Thai tigers. *Aust Vet J* 82 (11) 652.

Trevor E, Barry B, Lucy B, Kitman D, Geraldine L, Tsim S, Sturm-Ramirez K, Webster R, Guan Yi y Malik P.2004. Investigation of outbreaks of highly pathogenic H5N1 avian influenza in waterfowl and wild birds in Hong Kong in late 2002. *Avian Pathol.* 33 (5) 492-505.

Tripathy D y Hanson L. 1980. Avian Pox. En: Purchase H. G. (eds). *In A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens*. Pp. 109-1111[a] ed Ed. Kennett Square, PA: American Association Avian Pathologists.

Tripathy, D y Reed W. 2000. Viruela Aviar. En: Calnek, B (eds). *Enfermedades de las aves*. Pp 659-671 2° ed. Ed. El mundo moderno, México Df.

Venegas C. 1991. *Aves de Magallanes*. Editorial Antártica. Chile.

Verdugo C. 2004. Valores Hematológicos del Cisne de Cuello Negro (*Cygnus melancoryphus*, Molina 1782) en una Población Silvestre, Valdivia, Chile. *Memoria de Título*, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Austral de Chile.

Watson G. 1975. *Birds of the Antarctic & Subantarctic*. American Geophysical Union. Washington D.C. U.S.A.

Widjaja L, Krauss S, Webby R, Webster R, Xie T.2004. Matrix Gene of Influenza A Viruses Isolated from Wild Aquatic Birds: Ecology and Emergence of Influenza A Viruses. *J Virol* 78 (16) 8771–8779.

Webster R, Bean W, Hinshaw V, Murti G, Yakhno M. 1978. Intestinal Influenza: replication and Characterization of Influenza Viruses in Ducks. *Virol* 84 268-278.

Webster R, Bean W, Chambers T, Gorman O, Kawaoka Y. 1992. Evolution and Ecology of Influenza A Viruses. *Microbiol Rev* 56 (1) 152-179.

Weingartl H, Kumthekar P y Riva J. 2003. Molecular Characterization of Avian Paramixovirus 1 Isolates Collected from Cormorats in Canada from 1995 to 2000. *J. Clin. Microbiol* 41 (3) 1280-1284.

Zanetti F, Berinstein A, Carrillo E, Pereda A y Taboga O. 2005. Molecular Characterization and Phylogenetic Analysis of Newcastle Disease Virus Isolates from healthy Wild Birds. *Avian Dis* 49 546-550.

8. ANEXOS

ANEXO 1. Resultados de la prueba de Inhibición de la hemoaglutinación (IHA) a virus de la ENC y título medio en sueros de cisne de cuello negro obtenidos entre Octubre del 2004 a Marzo del 2005 en el Sector San Ramón del Santuario de la Naturaleza "Carlos Anwandter"

Fecha muestreo	N° de anillo de cisne	Título IHA
13-10-2004	100	64
13-10-2004	101	0
13-10-2004	102	0
13-10-2004	103	0
13-10-2004	104	0
13-10-2004	106	0
13-10-2004	107	0
13-10-2004	108	0
13-10-2004	109	0
13-10-2004	111	0
13-10-2004	112	0
13-10-2004	116	0
13-10-2004	117	0
13-10-2004	118	0
13-10-2004	119	0
27-10-2004	85	0
27-10-2004	98	0
27-10-2004	105	0
27-10-2004	110	0
27-10-2004	113	16
27-10-2004	114	0
27-10-2004	115	16
27-10-2004	121	16
27-10-2004	122	16
27-10-2004	123	16
27-10-2004	124	16
27-10-2004	125	16
27-10-2004	132	16
27-10-2004	133	16
27-10-2004	135	4
27-10-2004	136	8
27-10-2004	134	0
25-11-2004	126	16
25-11-2004	127	16
25-11-2004	128	32
25-11-2004	131	16
21-12-2004	65	32
21-12-2004	139	16

Fecha muestreo	N° de anillo de cisne	Título IHA
21-12-2004	140	16
21-12-2004	141	0
21-12-2004	142	0
21-12-2004	143	16
21-12-2004	144	32
21-12-2004	145	16
21-12-2004	146	0
21-12-2004	148	32
21-12-2004	149	16
21-12-2004	150	8
21-12-2004	151	0
21-12-2004	152	0
21-12-2004	153	0
21-12-2004	154	0
21-12-2004	155	0
21-12-2004	156	0
21-12-2004	158	0
21-12-2004	159	0
21-12-2004	161	0
24-02-2005	175	0
24-02-2005	176	0
24-02-2005	177	0
24-02-2005	178	0
24-02-2005	179	0
24-02-2005	180	0
24-02-2005	181	0
24-02-2005	182	0
24-02-2005	183	0
24-02-2005	184	16
03-03-2005	186	0
03-03-2005	187	32
03-03-2005	188	32
03-03-2005	189	128
03-03-2005	190	128
03-03-2005	191	256
03-03-2005	192	64
03-03-2005	193	0
03-03-2005	194	0
03-03-2005	195	64
Título medio		15,63

ANEXO 2. Resultados Inmunodifusión para Adenovirus tipo I, virus Viruela aviar e Influenza aviar en sueros de cisne de cuello negro muestreados entre Octubre del 2004 a Marzo del 2005 en el Sector San Ramón del del Santuario de la Naturaleza "Carlos Anwandter".

N° de anillo de cisne	Adenovirus tipo I	virus Viruela	virus Influenza aviar
100	-	-	-
101	-	-	-
102	-	-	-
103	+	-	-
104	-	-	-
106	-	-	-
107	-	-	-
108	-	-	-
109	-	-	-
111	-	-	-
112	-	-	-
116	+	-	-
117	-	-	-
118	+	-	-
119	-	-	-
85	-	-	-
98	-	-	-
105	-	-	-
110	-	-	-
113	-	-	-
114	-	-	-
115	-	-	-
121	-	-	-
122	-	-	-
123	-	-	-
124	-	-	-
125	-	-	-
132	-	-	-
133	-	-	-
135	-	-	-
136	-	-	-
134	-	-	-
126	-	-	-
127	-	-	-
128	-	-	-
131	-	-	-
65	+	-	-
139	+	-	-

N° de anillo de cisne	Adenovirus tipo I	virus Viruela	virus Influenza aviar
140	-	-	-
141	-	-	-
142	-	-	-
143	-	-	-
144	-	-	-
145	-	-	-
146	-	-	-
148	-	-	-
149	-	-	-
150	-	-	-
151	-	-	-
152	-	-	-
153	-	-	-
154	+	-	-
155	+	-	-
156	-	-	-
158	-	-	-
159	-	-	-
161	-	-	-
175	-	-	-
176	-	-	-
177	+	-	-
178	+	-	-
179	-	-	-
180	+	-	-
181	-	-	-
182	+	-	-
183	+	-	-
184	+	-	-
186	-	-	-
187	-	-	-
188	-	-	-
189	+	-	-
190	+	-	-
191	-	-	-
192	+	-	-
193	-	-	-
194	-	-	-
195	+	-	-

+: positivo
-: negativo

ANEXO 3. Distribución de los cisnes muestreados entre Octubre del 2004 a Marzo del 2005 en el Sector San Ramón del Santuario de la Naturaleza "Carlos Anwandter" según N° de anillo, sexo, edad y peso.

N° anillo cisne	Sexo		Edad		Peso (kg)
	H	M	A	J	
100	*		*		4,0
101		*	*		5,7
102		*	*		3,5
103		*	*		6,2
104		*	*		6,3
106		*	*		4,6
107	*		*		4,4
108	*		*		5,1
109		*	*		6,5
111	*		*		4,0
112	*			*	4,4
116		*	*		5,2
117		*	*		6,5
118	*		*		3,9
119		*	*		5,5
85	*		*		6,5
98	*		*		3,9
105		*	*		5,4
110		*	*		5,5
113		*	*		5,5
114		*	*		6,0
115		*	*		5,4
121		*	*		5,1
122		*	*		5,5
123	*		*		4,4
124		*	*		6,5
125		*	*		5,4
132		*	*		5,8
133		*	*		4,4
135		*	*		5,2
136	*		*		3,3
134		*	*		5,4
126		*	*		6,3
127	*			*	4,0
128	*		*		3,8
131	*		*		4,4
65	*		*		3,5
139	*		*		3,4

N° anillo cisne	Sexo		Edad		Peso (kg.)
	H	M	A	J	
140		*	*		5,4
141		*	*		4,7
142		*	*		5,9
143	*		*		3,6
144	*		*		3,5
145		*	*		4,0
146	*		*		3,5
148	*		*		4,6
149		*	*		4,1
150		*	*		4,8
151	*			*	3,0
152		*		*	5,0
153	*		*		4,5
154		*	*		4,3
155		*	*		5,5
156	*		*		3,1
158		*	*		5,1
159		*	*		5,4
161		*	*		4,7
175		*	*		6,3
176	*		*		5,3
177		*	*		4,7
178		*		*	3,3
179	*		*		3,9
180	*		*		5,2
181		*	*		4,7
182		*	*		4,1
183		*		*	4,5
184		*	*		4,5
186		*	*		3,6
187		*	*		5,1
188		*	*		3,3
189		*	*		3,7
190		*	*		4,1
191		*	*		4,7
192		*	*		4,1
193		*	*		5,0
194	*		*		3,0
195	*		*		4,0
Total (%)	26 (33,76)	51 (66,23)	71 (92,2)	6 (7,79)	362,2
Peso promedio	4,062	5,04	4,76	4,03	4,7039

H: Hembra, M: macho, A: Adulto, J: Juvenil

ANEXO 4. Total y porcentajes obtenidos de la distribución según sexo y edad de la muestra de cisnes obtenida del Santuario de la Naturaleza "Carlos Anwandter"

	Hembras Adultas	Hembras juveniles	Machos adultos	Machos juveniles
Total	23	3	48	3
Porcentaje	29,9	3,9	62,3	3,9

ANEXO 5. Seroprevalencia de virus de la ENC y Adenovirus tipo I, por sexo y edad en la muestra de cisnes obtenida en el Sector San Ramon en el Santuario de la Naturaleza "Carlos Anwandter".

N° de anillo de cisne	A. M. ENC	A. M. Adenovirus tipo I	A.H. ENC	A. H. Adenovirus tipo I	J. M. ENC	J. M. Adenovirus tipo I	J. H. ENC	J. H. Adenovirus tipo I
100			*					
101								
102								
103		*						
104								
106								
107								
108								
109								
111								
112								
116		*						
117								
118				*				
119								
85								
98								
105								
110								
113	*							
114								
115	*							
121	*							
122	*							
123			*					
124	*							

N° de anillo de cisne	A. M. ENC	A. M. Adenovirus tipo I	A.H. ENC	A. H. Adenovirus tipo I	J. M. ENC	J. M. Adenovirus tipo I	J. H. ENC	J. H. Adenovirus tipo I
125	*							
132	*							
133	*							
135	*							
136			*					
134								
126	*							
127							*	
128			*					
131			*					
65	*	*						
139			*	*				
140	*							
141								
142								
143			*					
144			*					
145	*							
146								
148			*					
149	*							
150	*							
151								
152								
153								
154		*						
155		*						
156								
158								
159								
161								
175								
176								
177		*						
178						*		

N° de anillo de cisne	A. M. ENC	A. M. Adenovirus tipo I	A.H. ENC	A. H. Adenovirus tipo I	J. M. ENC	J. M. Adenovirus tipo I	J. H. ENC	J. H. Adenovirus tipo I
179								
180				*				
181								
182		*						
183						*		
184	*	*						
186								
187	*							
188	*							
189	*	*						
190	*	*						
191	*							
192	*	*						
193								
194								
195			*	*				
Total	22	11	10	5	0	2	1	0
SP. %	28,5	14,2	12,9	6,4	0	2,6	1,3	0

H: Hembra, M: macho, A: Adulto, J: Juvenil, SP: Seroprevalencia.

ANEXO 6. Distribución de sueros positivos y negativos a la prueba de Inhibición de la hemoaglutinación para virus de la ENC en cisnes de cuello negro *(Cygnus melancoryphus)* del Santuario de la Naturaleza "Carlos Anwandter".

n	Sueros positivos		Sueros negativos	
	N°	%	N°	%
77	33	42,85	44	57,15

ANEXO 7. Autorización emitida por el Servicio Agrícola Ganadero (SAG), para el muestreo de los cisnes en el Santuario de la Naturaleza "Carlos Anwandter"

620
SEP 2004
GOBIERNO DE CHILE

Departamento de Protección de Recursos Naturales Renovables
Subdepartamento de Vida Silvestre

Vida Silvestre N° 1-59.2004

AUTORIZA A ROBERTO NESPOLO R. LA CAPTURA DE CISNES DE CUELLO NEGRO CON FINES CIENTIFICOS.

JEFE DEPARTAMENTO JURIDICO SUBROGANTE

SANTIAGO, 14 SEP 2004

N° 5368 VISTOS: Lo solicitado por el interesado con fecha 17 de agosto de 2004; el ORD. N° 747 de fecha 18 de agosto de 2004 del Jefe Oficina SAG Valdivia; la Ley 19.473; el Decreto de Agricultura N° 5 de 1998; la Resolución N° 2.073 de 2003 del Director Nacional del Servicio Agrícola y Ganadero; y, la Ley N° 18.755, Orgánica de este Servicio.

RESUELVO

PRIMERO: Autorízase al Sr. Roberto Nespolo Rossi, C.I. N° 13.919.685-1, con domicilio en el Instituto de Ecología y Evolución de la Universidad Austral de Chile, Valdivia, la captura de cisnes de cuello negro con fines científicos, bajo las condiciones de la presente Resolución.

SEGUNDO: Se autoriza la captura de un máximo de 500 ejemplares de cisne de cuello negro (*Cygnus melanocoryphus*), mediante chinguillos y redes, dentro del Santuario de la Naturaleza Carlos Adwanter, X Región, a contar desde la fecha de esta resolución y hasta el 31 de diciembre del 2006.

Los ejemplares capturados deberán ser liberados en los mismos sitios de colecta, en un plazo no mayor a 1 hora, luego de realizados los procedimientos planteados en la investigación, incluida la extracción de muestras de sangre y marcaje de los mismos. Durante el periodo reproductivo deberán extremarse las precauciones para evitar el abandono de nidos.

Durante las capturas se autoriza además, la participación de los Sr(a)s. Claudio Verdugo R., C.I. N° 14.131.581-1, Mauricio Soto G., C.I. N° 7.981.444-K, Paulina Artacho, C.I. N° 13.122.580-6, Luis Castañeda, C.I. N° 14.174.535-2, Marcela Franco, C.I. N° 21.356.293-3, María Soledad Aracena P., C.I. N° 15.450.503-2, y Constanza Villa A., C.I. N° 16.532.201-0.

Para la captura de los ejemplares, el interesado deberá contar con la autorización expresa dela Corporación Nacional Forestal.

TERCERO: En forma previa a las capturas, los interesados deberán informar por escrito, a la Oficina SAG Valdivia (fax 63-213984), las fechas de captura y liberación. Los interesados deberán brindar las facilidades para que personal del SAG extracción de muestras de sangre, para fines sanitarios, de los ejemplares que sean capturados.

CUARTO: En forma semestral, los interesados deberán enviar a la Direccion Regional SAG correspondiente y al Departamento de Protección de Recursos Naturales Renovables, un informe donde señale la cantidad de ejemplares capturados y liberados, así como información acerca de la eficiencia del método de captura y de los procedimientos generales efectuados. Una vez concluida la investigación, el Sr. Néspolo deberá enviar un informe con los resultados de la investigación, así como copia de las publicaciones, incluidas tesis y presentaciones a congresos, originadas en la autorizacion otorgada, debiendo hacer referencia en ellas del permiso expedido.

En el caso que la captura de los individuos no sea efectuada, los interesados deberá informar el hecho a la Oficina SAG Valdivia y al Departamento de Protección de Recursos Naturales Renovables.

QUINTO: Toda infracción a las disposiciones contenidas en la Ley de Caza y su Reglamento, y a la autorización que se le ha otorgado será sancionado por el Servicio Agrícola y Ganadero.

ANÓTESE Y COMUNÍQUESE

SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO DEPARTAMENTO DE PROTECCION DE LOS RECURSOS NATURALES RENOVABLES

HORACIO MERLET BADILLA
INGENIERO AGRONOMO
JEFE DEPARTAMENTO DE PROTECCIÓN
RECURSOS NATURALES RENOVABLES

CTG
DISTRIBUCIÓN:
Sr. Francisco Néspolo R., Instituto de Ecología y Evolución, U. Austral de Chile, Casilla 567, Valdivia.
Director Regional SAG, X Región.
DEPROREN.
Of. de Partes.

9. AGRADECIMIENTOS

Quisiera dar las gracias a mi profesor patrocinante el Dr. Jorge Ulloa, por su dirección y consejos que me permitieron terminar este trabajo, al Dr. Héctor Hidalgo por su apoyo y ayuda cuando estuve realizando las pruebas en la Universidad de Chile, al Dr. Mathieu por su amabilidad en mi paso por el Laboratorio central del SAG. A Gisela González, por su valioso aporte de antígenos para la inmunodifusión.

A Dr. Claudio Verdugo, Dr. Roberto Néspolo, Dr. Mauricio Soto, Paulina Artacho y a los guardaparques de la CONAF por su ayuda en el periodo de muestreo.

A Carlos Hernández por su paciencia y ayuda en el test de IHA y aislamiento viral.

A mis padres y hermanos por su apoyo incondicional a pesar de la distancia que nos separa. A Vicente por su cariño infaltable.

Y a todas aquellas personas que de alguna u otra forma hicieron posible la finalización de este trabajo.