



**UNIVERSIDAD
SAN SEBASTIAN**
VOCACIÓN POR LA EXCELENCIA

**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA NATURALEZA
ESCUELA DE MEDICINA VETERINARIA
CARRERA MEDICINA VETERINARIA
SEDE LA PATAGONIA**

**DETECCIÓN MOLECULAR DE MATERIAL GENÉTICO DEL VIRUS
CAUSANTE DE GRIPE AVIAR EN FECAS DE LOBOS MARINOS
OBTENIDAS DESDE EL MERCADO DE ANGELMÓ PUERTO MONTT
PROYECTO DE MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE MÉDICO VETERINARIO**

Profesora guía: Dra. Danixa Pamela Martínez González
Estudiante: Nicolás Cornejo Guerra

Puerto Montt, Chile

2024

DERECHOS DE AUTOR

© Nicolás Alejandro Cornejo Guerra

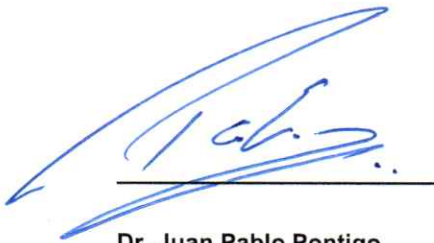
Se autoriza la reproducción parcial o total de esta obra con fines académicos, por cualquier forma, medio o procedimiento, siempre y cuando se incluya la cita bibliográfica del documento.

Puerto Montt, Chile

2024

HOJA DE CALIFICACIÓN

En Puerto Montt el 23 de julio de 2024 los abajo firmantes dejan constancia que el (la) estudiante Nicolas Cornejo Guerra de la carrera o programa de Medicina Veterinaria ha aprobado la tesis para optar al título o grado académico de Médico Veterinario con una nota de 60



Dr. Juan Pablo Pontigo



Dr. Marcos Godoy



Dra. Danixa Martínez

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a mi profesora guía Danixa Martínez, gracias por su entrega de conocimientos, apoyo, buena disposición y entrega en mi memoria, sacrificando tiempos libres para acompañarme en mi trabajo. Además de siempre motivarme en los momentos de faltas de ideas, desmotivaciones relacionadas al escrito y siempre hacerme sentir acompañado en este proceso

Agradezco a todo el personal del Centro de investigaciones biológicas aplicadas (CIBA), especialmente a don Marcos Godoy, por brindarme la posibilidad de trabajar en el laboratorio, dándome una oportunidad de vital importancia para la memoria y a Claudio Reyes, biotecnólogo del laboratorio, por su buena onda y su excelente disposición para guiarme y enseñarme sobre los procesos de extracción y pruebas de rtPCR. Además, siempre disponible para cualquier resolución de dudas y entregas de material importante necesario para el escrito.

Agradezco a mi familia, en especial a mi madre Nancy Guerra y mi padre José Cornejo, gracias enormemente a mi pareja hermosa Beatriz Guerrero, a Los Mandingos, Los Rorolovers y mis amigos de la Universidad por el apoyo, entrega de cariño y motivarme en momentos difíciles, sin ellos todo hubiera sido distinto.

TABLA DE CONTENIDOS

DERECHOS DE AUTOR	i
HOJA DE CALIFICACIÓN	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Distribución lobo marino en Chile:	1
1.2 Loberas antropogénicas y pesca artesanal:	1
1.3 Lobos marinos en Caleta de Angelmó:	2
1.4 Normativas sobre el lobo marino común en Chile.....	3
1.5 Zoonosis y enfermedades infecciosas Emergentes:	3
1.6 Microbiota intestinal lobos marinos	4
1.7 Patógenos en heces de lobos marinos comunes	4
1.7.1 Bacterias	4
1.7.2 Virus	5
1.8 Virus de la Influenza	6
1.8.1 H5N1.....	6
1.8.2 Presentación del cuadro y hallazgos patológicos en necropsias.....	7
1.8.3 Influenza Aviar en mamífero marinos en Chile.....	8
2. HIPÓTESIS.....	10
3. OBJETIVOS.....	10
3.1 Objetivo general:	10
3.2 Objetivos específicos:	10
4. MATERIALES Y MÉTODOS	11
4.1 Tipo de investigación:	11
4.2 Población de estudio	11
4.3 Tipo de muestra.....	11
4.4 Método estadístico.....	11
4.5 Toma de muestras	11
4.5.1 Procedimiento	11
4.5.2 Criterios de elección:	12
4.5.3 Almacenamiento de muestras	12
4.6 Laboratorio	13
4.6.1 Bioseguridad de laboratorio	13

4.6.2 Extracción ARN	14
4.6.3 RT-PCR	16
5. RESULTADOS	20
6. DISCUSIÓN	22
7. CONCLUSIÓN	25
REFERENCIAS	26

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Resultados qPCR muestra heces de lobos marinos	20
Tabla 2: Medidas estadísticas de la concentración ng/ul y relación 260/280	21

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Terrenos en mercado de Angelmó	13
Figura 2: Extracción ARN.	16
Figura 3: Distribución de placa de 96 pocillos.....	17
Figura 4: Componentes mezcla VetMAX.	17
Figura 5: Indicadores de temperatura, tiempo y ciclos de RT-PCR	18
Figura 6: Amplificación QuantStudio.	18
Figura 7: Interfaz general de PCR.....	18

RESUMEN

La influenza aviar H5N1 es una enfermedad infecciosa que forma parte de la familia *Orthomyxoviridae*, esta afecta principalmente aves y mamíferos marinos. H5N1 fue identificada por primera vez el año 1996 en Hong Kong, sin embargo, en 2022 casos incrementaron exponencialmente, esparciéndose por gran parte del planeta, generando gran preocupación en la salud pública, por su propiedad zoonótica e interés en la salud animal por su alta mortalidad. Chile no ha sido la excepción, H5N1 ha sido detectada en animales en las 16 regiones del país, obteniendo un peak de contagios el año 2023. Dentro de las especies marinas afectadas se encuentra el Lobo Marino (*Otaria flavescens*), esta especie figura como la principal damnificada en número de contagios e individuos fallecidos. Este mamífero marino es caracterizado por habitar en las costas de todo el largo del país principalmente en litorales que les proporcionen una fuente de alimento, descanso y refugio. Así mismo, estos conviven a la cercanía de humanos, principalmente trabajadores del área marítima, tales como, pescadores, recolectores de mariscos y comerciantes de los productos del mar. En este estudio nos enfocamos en el mercado de Angelmó de Puerto Montt, sitio donde existe interacción constantemente entre el lobo marino y el humano. En este lugar se realizaron tomas de muestras de heces de lobos marinos entre abril y marzo del 2024 de tipo ambiental, con el fin de identificar H5N1 en ellas. Muestras analizadas fueron 24 en total, las cuales, se realizaron pruebas de extracción de ARN y pruebas de PCR. Resultados de PCR en su totalidad catalogaron como negativas de la presencia del virus. Se sugiere realizar muestreos de forma activa, puesto que no podríamos tildar Angelmó libre de H5N1 con el número total de muestras analizadas, más bien, muestras estudiadas ser catalogadas como exentas de H5N1.

PALABRAS CLAVE

LOBOS MARINOS – INFLUENZA H5N1 – VIRUS – MERCADO ANGELMÓ

ABSTRACT

Avian influenza H5N1 is an infectious disease that is part of the *Orthomyxoviridae* family, which mainly affects birds and marine mammals. H5N1 was identified for the first time in 1996 in Hong Kong, however, in 2022 cases increased exponentially, spreading throughout most of the planet, generating great concern in public health, due to its zoonotic properties and interest in animal health because of its high mortality. Chile has not been the exception, H5N1 has been detected in animals in the 16 regions of the country, obtaining a peak of contagions in the year 2023. Among the affected marine species is the sea lion (*Otaria flavescens*), this species is the main victim in terms of number of infections and deaths. This marine mammal is characterized by inhabiting the coasts of the entire length of the country, mainly on coastlines that provide them with a source of food, rest and shelter. They also live in close proximity to humans, mainly workers in the maritime area, such as fishermen, shellfish gatherers and seafood traders. In this study we focused on the Angelmó market in Puerto Montt, a place where there is constant interaction between sea lions and humans. At this site, environmental samples of sea lion feces were taken between April and March 2024, in order to identify H5N1 in them. A total of 24 samples were analyzed and RNA extraction and PCR tests were performed. All PCR results were negative for the presence of the virus. It is suggested to perform active sampling, since we could not label Angelmó free of H5N1 with the total number of samples analyzed, rather, samples studied would be catalogued as free of H5N1

KEY WORDS

SEA LIONS - INFLUENZA H5N1 - VIRUS - ANGELMO MARKET

1. INTRODUCCIÓN

Chile posee una alta variedad de especies acuáticas, entre estos se encuentran los mamíferos marinos, específicamente el lobo marino. En el país se encuentran 4 especies: lobo marino común (*Otaria flavescens*), lobo fino austral (*Arctocephalus australis*), lobo fino subantártico (*Arctocephalus tropicalis*) y lobo fino de Juan Fernández (*Arctocephalus philippii*) (Weinberger, 2013). El lobo marino común (*Otaria flavescens*) es el más numeroso en el territorio nacional, este posee un cuerpo robusto, pabellón auricular externo, extremidades delanteras y traseras en formas de aletas que les permiten trotar, galopar, saltar e incluso trepar distintas estructuras (Bello, 2018; Gallo y Maravilla, 2000). Referido a su alimentación, este se define como consumidor secundario o depredador, su dieta es variada en peces, moluscos y crustáceos y su ingesta depende de en qué lugar geográfico del país se encuentre (Hucke y Ruiz 2010).

1.1 Distribución lobo marino en Chile:

Este mamífero se distribuye en todo nuestro territorio, asociándose a litorales de tipo rocoso que ofrecen grietas y cuevas (Pavés et al., 2020). En un censo realizado el año 2019 por la Universidad de Valparaíso, se estimó la cifra de unos 124.000 ejemplares de lobo marino común (*Otaria flavescens*) y alrededor de 216 loberas. El mayor número de lobos marinos y loberas se encuentra en la zona sur del país, específicamente en la Región de los Lagos, estimándose unos 45.000 individuos. Esto sería un poco más del 36% de la población total de lobos en el país, en comparación con la Región de Aysén, donde se establece el mayor número de loberas (lugar de asentamiento) (Oliva et al., 2019).

1.2 Loberas antropogénicas y pesca artesanal:

Como antes se mencionó, la agrupación de lobos se les denomina loberas, estas se subdividen en 3 tipos: loberas reproductivas, loberas de descanso y loberas antropogénicas. Estas últimas se refieren a las zonas o estructuras utilizadas por los hombres en temas acuícolas, pesqueros, así como, muelles, boyas o barcos (Oliva et al., 2019). El gran número de ejemplares en la zona refleja las diversas problemáticas que sufren los trabajadores del área marítima en su interacción con los lobos, tales como daños en los materiales de pesca, apropiación de capturas, ataques directos a los pescadores, entre otros (Sanguinetti et al, 2020). Esto ha llevado incluso a realizar

seminarios en la Región de Los Lagos para abordar la interacción lobo-humano, es más en el año 2019 la subsecretaría de pesca y acuicultura implementó una llamada “mesa del lobo”, en la que se acordaron una serie de medidas para disminuir las interacciones negativas entre esta especie y los trabajadores que se desempeñan asociados al mar y sus recursos. Entorno a esta iniciativa fue publicado un tipo de manual de buenas prácticas que promueve, evitar alimentar a los lobos marinos, fomentar el reciclaje de los residuos de la pesca y no atacarlos mediante proyectiles o detonantes (AQUA, 2020). En otras regiones (II, IV y X) del país se han integrado nuevas tecnologías, específicamente equipos de ultrasonido que alejan a los lobos marinos de los pescadores. Este consta de una lancha que contiene un parlante submarino que emite ondas de sonido, ahuyentando a los mamíferos que están a una distancia de 15 metros aproximadamente (SUBPESCA, 2019).

1.3 Lobos marinos en Caleta de Angelmó:

Angelmó es el mercado y feria artesanal típica de la ciudad de Puerto Montt y está ubicado a 2 km desde la plaza de armas de la ciudad frente a la Isla Tenglo. Este atractivo turístico no se exceptúa del asentamiento de estos mamíferos marinos debido a la cercanía entre la costa y los locales comerciales. Los lobos marinos se acercan a la caleta en busca de un acceso sencillo y rápido de alimento, además, de lugar de refugio y descanso. Los lobos marinos que están en el mercado de Angelmó se apropian de los contenedores de basura designados al mercado, obteniendo contacto con restos y mermas de subproductos marinos, dicho de otra forma, con la basura y desechos originados de la comercialización de recursos marinos. Esta interacción entre lobos marinos y humanos incrementa la posibilidad de una exposición a microorganismos no deseados desde ambos lados, por consiguiente, causar efectos no anhelados en la salud de ambos. El lobo marino, además de alimentarse desde el contenedor de desechos biológicos originados del comercio del mercado, se desplaza mediante los espacios del mercado, comportándose como vector de infecciones bacterianas y virulentas. (Bio bío, 2022; Visitchile 2019).

1.4 Normativas sobre el lobo marino común en Chile

El 21 de enero de 2021 se renovó la veda extractiva sobre el lobo marino común, “en todo el territorio y aguas jurisdiccionales de la República, por el término de diez años, contados desde el día 27 de enero de 2021, en la forma y condiciones allí establecidas” (Arancibia, 2022).

El decreto consta de 8 artículos:

- 1) Renovación de la veda.
- 2) Prohibición de la tenencia, transporte, posesión o almacenamiento de especies enteras o distintas partes y estructuras.
- 3) Toma de resoluciones en casos de depredación de los lobos a especies amenazadas y protegidas de forma oficial.
- 4) Se permiten capturas en casos de investigaciones científicas, rescates y relocalizaciones.
- 5) Caza se podría permitir en circunstancias de graves riesgo físico, salud y vida humana.
- 6) Se permite caza de máximo 60 unidades, en usos de tradiciones ancestrales de la comunidad indígena Kawésqar.
- 7) SERNAPESCA debe procurar que las medidas propuestas en el decreto sean cumplidas, además de derivar ejemplares muertos para fines de docencia, exhibición, investigación dentro del territorio nacional.
- 8) La infracción a lo propuesto en el decreto será sancionada con el procedimiento y penas contempladas por el Ministerio de Economía, Fomento y Turismo (Ministerio de Economía, Fomento y Turismo, 2021).

1.5 Zoonosis y enfermedades infecciosas Emergentes:

Se define como zoonosis a una enfermedad de tipo infecciosa que ha sido traspasada de un animal a humanos por causa de bacterias, virus o parásitos. Las enfermedades zoonóticas pueden ser transmitidas de forma directa, secreciones, alimentos y/o medio ambiente (OMS, 2020). En los últimos años hemos visto la importancia epidemiológica de las relaciones animal-humano, el aumento de las actividades de los humanos y el crecimiento de la población han causado una expansión en todo tipo de territorios (Medina, 2010). Las relaciones dadas por distintos cambios de hábitat, formas de

alimentarse y malos hábitos de la sociedad han provocado una alteración en la forma de interactuar. “El inadecuado tratamiento y eliminación de aguas residuales, así como de otros efluentes de las actividades agrícolas han producido la contaminación del ambiente marino” (Sturm, 2011). Eso último es solo alguno de los ejemplos que conllevan al incremento de transporte de patógenos desde ambas zonas.

Las distintas formas de distinguir el origen de enfermedades que provienen de otras especies son las siguientes: “i) aquellas que se presentan debido a que la susceptibilidad del huésped se ha visto incrementada; ii) aquellas que, debido a cambios ambientales, que favorecen al patógeno, se han tornado más virulentas; y iii) aquellas en que los patógenos recientemente han invadido nuevos huéspedes, con el sistema inmune debilitado, debido a situaciones ambientales adversas (Medina, 2010).

1.6 Microbiota intestinal lobos marinos

Concepto “microbiota” o también llamada “microflora” se refiere al tipo de ecosistema microbiano que coloniza en este caso el tracto gastrointestinal. Estos le permiten al individuo la digestión y la absorción de nutrientes, funciones metabólicas, además, funciones de protección y defensa de microorganismos externos al ambiente, funcionando gracias a un equilibrio del entorno ambiental y ecológico (Guarner, 2007). En el lobo marino común se destacan 3 principales microorganismos que se han catalogado como propios de su microbiota intestinal, entre estos se encuentran *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* y *Edwardsiella tarda*. *E. coli* se señala como la bacteria más abundante de la microbiota y al igual que *E. tarda* se cataloga como patógeno oportunista. *E. coli* se ha identificado como causante de septicemias y responsable de infecciones de heridas y lesiones cutáneas. Por otro lado, *E. tarda* se describe como un causante de infecciones importantes en el humano transmitidas por el agua, provocando gastroenteritis, endocarditis, abscesos intraabdominales, meningitis y meningitis (Hermosilla et al., 2018).

1.7 Patógenos en heces de lobos marinos comunes

1.7.1 Bacterias

En estudios hechos en Chile han descubierto patógenos importantes para la salud humana y animal en el lobo marino común, entre los cuales se encuentran *Salmonella*

entérica, *Escherichia coli* enteropatógena, *Pastúrela aeruginosa*, *Klebsiella* e incluso *Leptospira* (González et al., 2010). En un estudio realizado el año 2017 por la Universidad Austral de Chile, se recolectaron heces frescas de 38 lobos marinos común de una plataforma ubicada en el río de Valdivia, lugar que mantiene proximidad con distintas actividades, tales como pesca, comercio, deportes náuticos y turismo, por lo tanto, un contacto cercano con el humano. Cabe mencionar que el sistema de alcantarillado es conectado con el río y gran parte de los desechos llegan de forma directa a estas aguas. De las muestras tomadas se realizaron 2 tipos de pruebas, las cuales serían cultivos bacterianos en agar ESB/L y muestras para PCR. En resumen, se presentaron 22 colonias de *E. coli*, 1 colonia a *Proteus*, *Morganella* o *Providencia* y 1 colonia a *Klebsiella*. En los resultados de PCR, se les realizó la prueba a las 22 muestras con los resultados de colonias, 15 de las muestras resultaron con alguna respuesta y estas reaccionaron a 4 principales tipos de partidores (SHV, OXA, CTX-M GRUPO 1 y CTX-M GRUPO 2). Los partidores utilizados se encuentran relacionados a diferentes bacterias, la familia SHV se conecta principalmente con *Klebsiella pneumoniae*, OXA es originada normalmente por *Pasteurella aeruginosa* y el grupo CTX se asocia a *Salmonella entérica serovar typhimurium* y *E. coli*, principalmente (Jara, 2017).

1.7.2 Virus

Poliomavirus, *Adenovirus*, *Morbillivirus* y *Virus de la influenza A (IAV)*, son algunos de los virus de gran importancia advertidos en lobos marinos. *Morbillivirus* y *IAV* han sido clasificados como enfermedades emergentes o reemergentes que en determinado momento se encontraban identificadas y se mantenían controladas, sin embargo, por distintas razones, comienzan a formar un caos e inciden de manera negativa en las poblaciones de animales. La aparición de *Morbillivirus canino* en animales marinos se relaciona directamente con la introducción de perros domésticos en áreas silvestres, recién en el año 1988 se identificaron los primeros contagios de mamíferos marinos con el virus, antes de eso la enfermedad era comúnmente descrita solo en caninos. Esto se termina de confirmar al momento de realizar análisis molecular de ambas variantes, obteniendo una similitud destacable (Cortés-Hinojosa et al., 2016). Actualmente, se describe *Morbillivirus* como un virus altamente contagioso capaz de infectar distintos

hospederos y serovariedades. En los últimos años, se han reportado mortalidades masivas de lobos marinos californianos (*Zalophus californianus*), Delfines (*Delphinidae*) y Focas (*Phoca Vitulina*) (Ziehl, 2015).

1.8 Virus de la Influenza

Los virus de la influenza son parte de la familia *Orthomyxoviridae* que se caracterizan por poseer un genoma de ARN monocatenario de sentido negativo con 6-8 segmentos. El Virus de la influenza se subdivide en 4 tipos de géneros y cada uno de estos géneros posee una única especie: El género *Alphainfluenzavirus* posee la especie Influenza A (IAV), el género *Betainfluenzavirus* dispone al virus de la influenza B (IBV), el género *Gammainfluenzavirus* ostenta el virus de la influenza C (ICV) y el género *Deltainfluenzavirus* posee el virus de la influenza D (IDV).

IAV posee la mayor variabilidad genética de las demás especies, esta se divide en subtipos según la antigenicidad de sus glicoproteínas de envoltura, las cuales son Hemaglutinina (H) y Neuraminidasa (N). Hasta el momento existen 16 subtipos de Hemaglutininas y 9 subtipos de Neuraminidasa (Godoy et al., 2023).

En la actualidad, casi la totalidad de subtipos de IAV, exceptuando H17-18 y N10-11, han sido descritas en aves acuáticas, silvestres y de corral. Esto direcciona a las aves como reservorio natural del virus. Igualmente, animales de cercanía próxima al humano se han destacado como reservorios de IAV, uno de ellos es el caballo donde se han encontrado 2 subtipos (H7N7 y H3N8), el cerdo es otro reservorio donde se han determinado dos subtipos (H1N1 y H3N2) (Kandeil et al., 2023).

1.8.1 H5N1

La Influenza aviar de alta patogenicidad, causada por el subtipo H5N1 fue identificado en China el año 1996. Generalmente, estos solían presentarse como brotes esporádicos en otoño y solían disminuir y desaparecer en la primavera de Europa y Asia. No obstante, en el año 2022, los casos siguieron presenciándose de manera evidente durante todo el verano. Seguido a esto se evidenciaron brotes en Norte América y luego procediendo a Sudamérica. Actualmente H5N1 se ha diseminado por casi la totalidad del territorio mundial, ostentando como principal responsable las aves acuáticas silvestres migratorias. Las distintas rutas movilizan individuos contagiados, propagando el virus y dificultando su erradicación. Las rutas del Atlántico desde

América del Norte hacían América del sur, son la conexión que comúnmente moviliza el virus hacía Sudamérica. Esto se corrobora con hallazgos de segmentos idénticos en la secuenciación del virus presentado en ambos territorios. Distintos factores registran esta enfermedad como de suma importancia a nivel mundial, puesto que, es catalogada una enfermedad de tipo zoonótica con altos niveles de mortalidad en aves y mamíferos marinos, incidiendo negativamente en la economía global (Günther et al., 2022; OIE, 2023). Así mismo, últimas investigaciones realizadas sobre el virus, han notificado en Norte América, presencia del virus H5N1 incluso en ganado lechero, de hecho, se detalla el mismo genotipo (D1.1) presente en aves migratorias, silvestres y de corral descritos en América del Norte. En vacas cuadro clínico se describe de carácter leve, falta de apetito, reducción de la producción de leche y aspecto anormal esta misma suelen ser algunos de los signos, así mismo, tratamiento de apoyo resulta tener buena respuesta de individuos, logrando la mayoría recuperarse del cuadro. Ahora bien, desde abril del 2024 en Estados Unidos, rige una orden federal que requiere realizar pruebas para detectar el virus H5N1 en el ganado lechero en el período de lactancia antes de estos ser transportados entre estados, esto se suma a diferentes restricciones y requisitos para importaciones y exportaciones en la región, así pues, es como H5N3 ha tomado relevancia e importancia en distintas áreas en distintas zonas del país (AVMA, 2025).

1.8.2 Presentación del cuadro y hallazgos patológicos en necropsias

Se ha identificado el virus en aves silvestres, aves de corral, mamíferos marinos silvestres, mamíferos domésticos e incluso humanos, sin embargo, los cuadros de alta gravedad se han manifestado principalmente en aves y mamíferos marinos (OMS, 2023). Animales positivos a H5N1 presentan generalmente sinología respiratoria y nerviosa. Los individuos se describen con presencia de ataxia, paresia, nistagmos e inconciencia, además, se ha observado taquipnea, disnea y existencia de secreciones. Las aves se describen como desorientadas, imposibilitadas al vuelo y con dificultades para mantenerse de pie. Por otro lado, los mamíferos marinos, específicamente el Lobo marino (*Otaria flavescens*) se encuentran varadas, desorientadas y con ruidos respiratorios (Godoy et al., 2023).

En un informe presentado por la Facultad de Veterinaria de Universidad de Las Palmas, España en conjunto con la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, se describen 2 lobos marinos llevados a necropsia por sospecha de influenza aviar. En primer lugar, se describe necropsia realizada a un lobo marino macho subadulto, de buena condición corporal, con un peso que oscila entre 70 a 80 kg. Este presentaba signos asociados a cuadros respiratorios y neurológicos. La prueba de hisopos orales, nasales y rectales resultaron negativos. En el examen post mortem se presentaron principalmente lesiones macroscópicas en pulmones, estos se exhibían hiperémicos, con atelectasia y áreas enfisematosas. Se realizaron pruebas de PCR en tejidos, hallándose en cerebro, pulmones, hígado, vejiga y corazón presencia del virus. Por otro lado, el segundo individuo correspondería a una hembra, que en el examen físico presentaba baja condición corporal, atrofia muscular y debilidad física. En la examinación post mortem se identificó congestión del hígado y vasos mesentéricos, junto con sus nódulos linfáticos. Se presentó pruebas de hisopos positivas orales, rectales y traqueales del virus.

En el estudio histopatológico se presentaron los siguientes hallazgos: Enfisema y exudado en la luz bronquial y enfisema multifocal con exudado mucoso en pulmón, miocarditis necrosante focal y pancreatitis necrotizantes. Finalmente, en cerebro se encontraron hallazgos de meningitis mononuclear, encefalitis, gliosis y necrosis neuronal (Ulloa et al., 2023).

1.8.3 Influenza Aviar en mamífero marinos en Chile

En febrero del año 2023, se confirma el primer caso positivo de la cepa de alta patogenicidad (IAAP) de Influenza Aviar en mamíferos marinos del territorio nacional. El individuo se identificó como lobo marino común (*Otaria flavescens*) macho, de aproximadamente 250 kg que varó en la playa Huáscar en la región de Antofagasta, presentando signología respiratoria e incapacidad de incorporarse. Con la llegada de las autoridades encargadas, se procedieron a la toma de muestras para la posterior realización de pruebas diagnósticas (PCR), dando positivo a Influenza Aviar. Hasta ese momento en Chile solo se había detectado el virus en aves y con este primer caso informado en un mamífero marino, SERNAPESCA activó su protocolo especial para varamientos de animales marinos (SUBPESCA, 2023).

La infección en animales marinos se ha repartido por todo el largo del territorio nacional, obteniendo como principal área la zona Norte del país, destacando las Regiones de Arica y Parinacota (XV), Antofagasta (II) y Atacama (III). Hasta la fecha se han detectado más de 24.000 casos de Influenza Aviar en animales marinos, distintas especies han sido afectadas, tales como lobos marinos (*Otaria flavescens*), Pingüinos de Humboldt (*Spheniscus humboldt*), Chungungos (*Lontra felina*), Marsopa espinosa (*Phocoena spinipinnis*), Huillin (*Lontra provocax*) y Delfín chileno (*Cephalorhynchus eutropia*). En cuanto al lobo marino, este ha sido la especie con más casos identificados con alrededor de 18.000 animales positivos, seguido por el pingüino de Humboldt con 2.800 casos. Estas cifras son altísimas, según la cantidad de población que se estima para ambos tipos de especies (SERNAPESCA, 2023; Ulloa et al. 2023).

2. HIPÓTESIS

H0: Lobos marinos que residen en el Mercado de Angelmó de Puerto Montt no son portadores de *H5N1*.

H1: Lobos marinos que residen en el Mercado de Angelmó de Puerto Montt son portadores de *H5N1*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general:

Examinar el estado sanitario de los lobos marinos (*Otaria flavescens*) que residen en el mercado de Angelmó en Puerto Montt con respecto a H5N1, para así sugerir el desarrollo de normas que delimiten a su interacción con los seres humanos.

3.2 Objetivos específicos:

- 1- Detectar mediante técnicas moleculares material genético del virus causante de gripe aviar en las heces de lobos marinos que residen en el mercado de Angelmó.
- 2- Calcular la prevalencia del virus causante de gripe aviar en los lobos marinos que residen en el mercado de Angelmó.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Tipo de investigación:

Esta investigación corresponde a un estudio de tipo observacional longitudinal prospectivo analítico, en el que se buscó material genético de Influenza virus A subtipo H5N1 en muestras de heces frescas recolectadas desde el mercado de Angelmó de Puerto Montt. La investigación tuvo una duración de 2 meses, desde abril a mayo del año 2024, durante este periodo se recolectaron heces frescas en frascos estériles que fueron sometidas a pruebas de biología molecular (qPCR).

4.2 Población de estudio

La población investigada fueron los lobos marinos de Angelmó, estos circulan frecuentemente en la costa de la caleta, plataformas y contenedores del mercado, por día se encontraban hasta 6 individuos en un mismo rango horario (cantidad total específica solo se pudo estimar).

4.3 Tipo de muestra

Al no reconocer con exactitud en número la población, además de no conseguir obtener contacto con los individuos totales existentes. El tipo de muestra se catalogó como tipo por conveniencia, esta se describe como “tipo de muestreo donde se permite seleccionar individuos accesibles y próximos al investigador” (Otzen y Manterola, 2017).

4.4 Método estadístico

Se utilizó estadística descriptiva concordante a los resultados obtenidos al final del proceso experimental. Tablas de frecuencias y tablas analíticas.

4.5 Toma de muestras

4.5.1 Procedimiento

El inicio de recolección de muestras comenzó el viernes 12 de abril del año 2024, realizando todos los muestreos siguientes los viernes de abril y mayo. Es decir, toma de muestras el viernes 12 de abril, viernes 19 abril, viernes 26 abril, viernes 3 de mayo, viernes 10 de mayo, viernes 17 de mayo, viernes 24 de mayo y viernes 31 de mayo. Las muestras de heces se tomaron evitando cualquier tipo de contaminación secundaria, así mismo, se recolectaron muestras lo más frescas posibles (recién evacuadas). Se utilizaron guantes asépticos, tómulas estériles para recoger las heces y frascos de muestra estériles para resguardar la muestra, los cuales, fueron rotulados

con su fecha y número correspondiente. Las muestras fueron de tipo “ambiental”, estas no pudieron ser específicamente identificadas por individuo. Para no repetir las mismas muestras por individuo y justificar muestra como “recién evacuada”, se utilizó como respaldo material fotográfico, además, video de la actividad y del sujeto del que provino la muestra.

4.5.2 Criterios de elección:

Criterios de inclusión:

- Heces de lobos marinos
- Heces frescas
- Heces recién evacuadas
- Heces no contaminadas

Criterios de exclusión:

- Muestras contaminadas
- Heces no frescas
- Heces de otro animal

4.5.3 Almacenamiento de muestras

El frasco con contenido de heces fue almacenado en coolers junto con gel packs a temperatura optima de conservación, al término del muestreo diario, fueron dirigidas hacia el Centro de investigaciones biológicas aplicadas (CIBA), ubicada en la Sede la Patagonia de la Universidad San Sebastián Puerto Montt donde fueron analizadas.

Figura 1: Terrenos en mercado de Angelmó

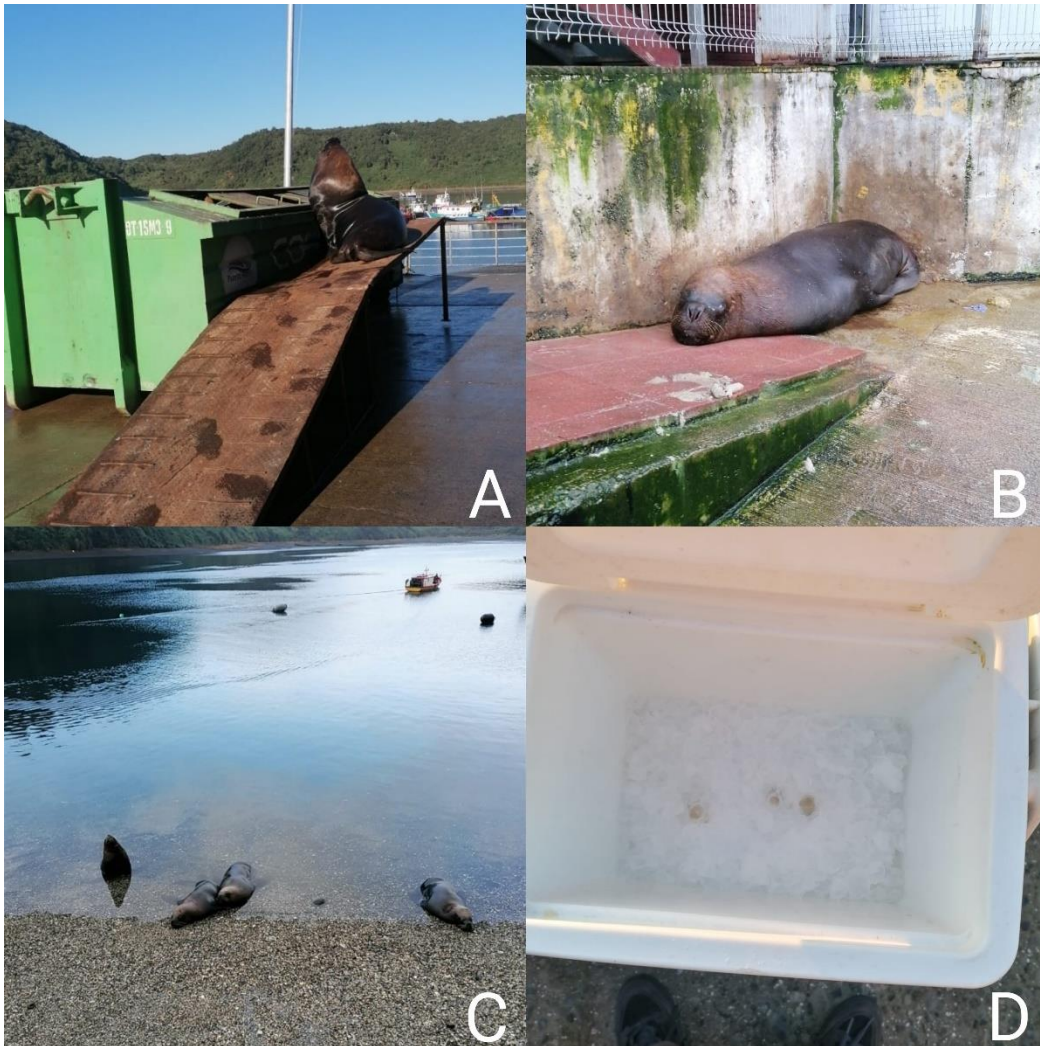


Figura 1: *A. Lobo marino en contenedor de basura de Angelmó, B. Lobo marino junto sus heces, C. Lobos marinos descansando en costa de la caleta, D. Cooler de almacenamiento de muestras*

4.6 Laboratorio

4.6.1 Bioseguridad de laboratorio

- Trabajar en un laboratorio designado.
- Usos de equipos de protección personal: Guantes, batas, mascarillas y gafas de seguridad.
- Prácticas de laboratorio seguras: Una manipulación aséptica, lavado permanentemente de manos, además de una eliminación adecuadas de desechos (Instituto de Salud Pública, 2019).

4.6.2 Extracción ARN

Se realizó prueba de extracción de ARN microbiano utilizando Kit RNeasy Powerfecal Pro. Kit diseñado para su uso en sustancias inhibidoras de la PCR que contienen las heces (Figura 1).

Principio y procedimiento descrito por fabricante:

El material inicial recomendado es de 50 a 200 mg de heces. Cada muestra se homogeneiza en un tubo batidor de perlas de 2 ml que contiene una mezcla de perlas de lisis. La lisis de las células microbianas y del huésped se ve facilitada tanto por colisiones mecánicas entre perlas como por la alteración química de las membranas celulares. Luego, la IRT se utiliza para eliminar sustancias comunes en las muestras de heces que interfieren con la PCR y otras aplicaciones posteriores. Luego, el lisado se pasa a través de una columna de centrifugación de ARN MB. El ADN se elimina mediante digestión con ADNasa en columna seguida de una solución de lavado. Esto elimina la enzima y los ácidos nucleicos digeridos. El ARN diluido en agua libre de RNasa está listo para usarse en cualquier aplicación posterior (Qiagen, 2022).

4.6.2.1 Contenido del kit

- Tubos PowerBead Pro
- Solución CD1
- Solución CD2
- Columnas de centrifugación de ARN MB
- Tubos de recogida 2 ml
- Solución EA
- Solución C5
- Agua libre de RNasa
- Solución de digestión de ADNasa
- ADNasa I (liofilizada)
- Tubos de microcentrífuga, 2 ml.
- Tubos de elución, 1,5 ml
- Protocolo de inicio rápido

4.6.2.2 Equipos y reactivos que se deben suministrar

- Fenol-cloroformo-alcohol isoamílico
- Pipetas y puntas de pipeta desechables con barreras de aerosol (20–1000 µl)
- Guantes desechables
- Micro centrífuga (con rotor para tubos de 1,5 y 2 ml)
- Vortex-Genie®2
- Equipo para disgregación y homogeneización de muestras

(Qiagen, 2022)

4.6.2.3 Procedimiento

1. Comenzamos identificando el número de muestras con las que trabajamos, consecutivo a esto, por cada muestra usaremos un tubo “Power Bead Pro Tube”.
2. Se adicionan entre 50 – 100 mg de muestra en tubo “Power Bead Pro Tube”.
3. Adicionamos 650 uL de Solución CD1 y 100 uL de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico.
4. Homogenizamos en vortex a máxima velocidad durante 10 minutos.
5. Centrifugamos tubo “Power Bead Pro Tube a 15.000 G durante 1 minuto.
6. Transferimos sobrenadante a tubo de micro centrifuga de 2 ml.
7. Adicionamos 200 uL de solución CD2 y agitamos durante 5 segundos. Centrifugamos a 15.000 G durante 1 minuto.
8. Transferimos 300 uL de sobrenadante a un tubo de micro centrifuga limpio de 2 ml.
9. Adicionamos 300 uL de Solución EA y luego agitamos brevemente.
10. Cargamos 600 uL de sobrenadante + Solución EA en columna de centrifugación de “MB ARN”. Centrifugamos a 15.000 G por 1 minuto y desechamos sobrenadante.
11. Adicionamos 650 uL de solución EA y centrifugamos a 15.000 G durante 1 minuto.
12. Colocamos columna de “MB ARN” en tubo colector limpio y adicionamos 50uL de Solución de ADNasa I al centro de columna.
13. Incubamos a temperatura ambiente durante 15 minutos.
14. Adicionamos 650 uL de Solución EA, centrifugamos a 15.000 G durante 1 minuto y luego desechamos sobrenadante.
15. Adicionamos 500 uL de Solución EA, centrifugamos a 15.000 G durante 1 minuto y luego desechamos sobrenadante.
16. Colocamos columna en tubo colector limpio y centrifugamos a 15.000 G durante 1 minuto.
17. Colocamos columna “MB ARN” en un tubo microcentrífuga limpio de 1,5 ml
18. Adicionamos 100 uL de “RNase-free wáter” e incubamos a temperatura ambiente durante 1 minuto.
19. Centrifugamos por última vez a 15.000 por 1 minuto, desechamos columna de MB ARN y obtenemos ARN finalmente purificado.

Figura 2: Extracción ARN.



Figura 2: **A.** Adición de 50mg de heces en tubo “Powerade Bead Pro Tube”, **B.** Solución EA, CD1, CD2 y RNase-free wáter, **C.** ADNasa y **D.** Cuantificación

4.6.3 RT-PCR

Para realizar la prueba de PCR en tiempo real se utilizó el producto. VetMAX™-Gold AIV Detection Kit (Figura 2).

En primer lugar, determinamos el número de muestras con las que se trabajará por prueba, además de realizar el proceso de descongelación de reactivos.

Adición de reactivos fueron distribuidos en placas de reacción de 96 pocillos:

Figura 3: Distribución de placa de 96 pocillos

	M1										
	M2										
	M3										
											CPM
	B										
											CPm

M: Muestra B: Blanco CPM: Control Positivo mayor CPm: Control positivo menor

- **Muestra:** ARN purificado → 8 uL
- **Control positivo:** Mezcla de control de ARN del virus de influenza → 8uL

Cada muestra fue adicionada con la mezcla maestra del Vetmax.

Mezcla maestra es integrada por los siguientes elementos:

Figura 4: Componentes mezcla VetMAX.

Componentes	Volumen por muestra
2X Multiplex RT-PCR buffer	6,25 ul
Multiplex RT- PCR enzima Mix	1,25 uL
Virus influenza primers-probe Mix	0,5 uL
Nuclease-free Water	0,5 uL
Volumen total del Mix	8,5 uL

Placa de 96 pocillos con sus componentes es introducida a un termociclador.

Realización e interpretación de PCR en tiempo real es realizado por software QuantStudio.

Ciclos del termociclador:

Figura 5: Indicadores de temperatura, tiempo y ciclos de RT-PCR

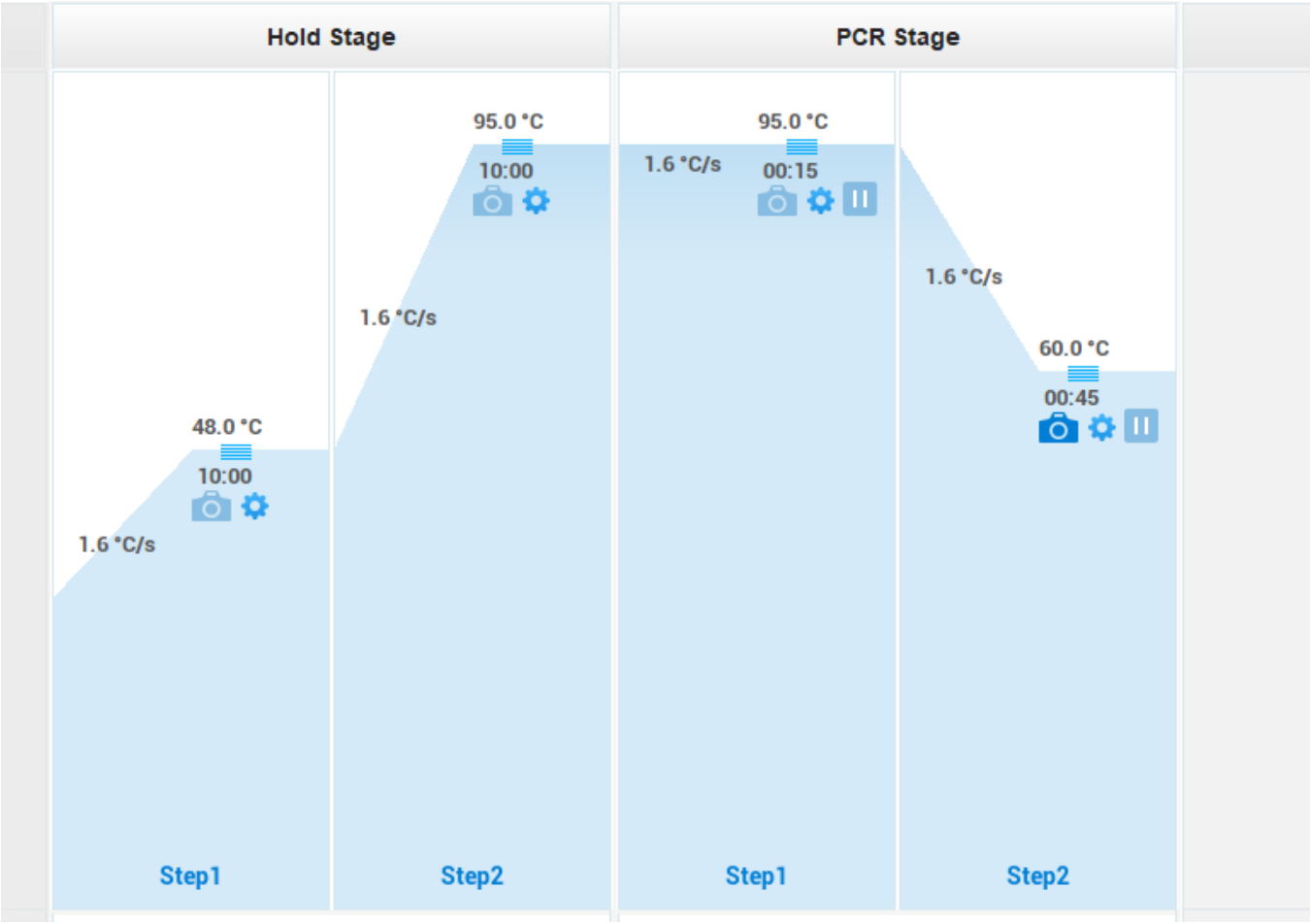
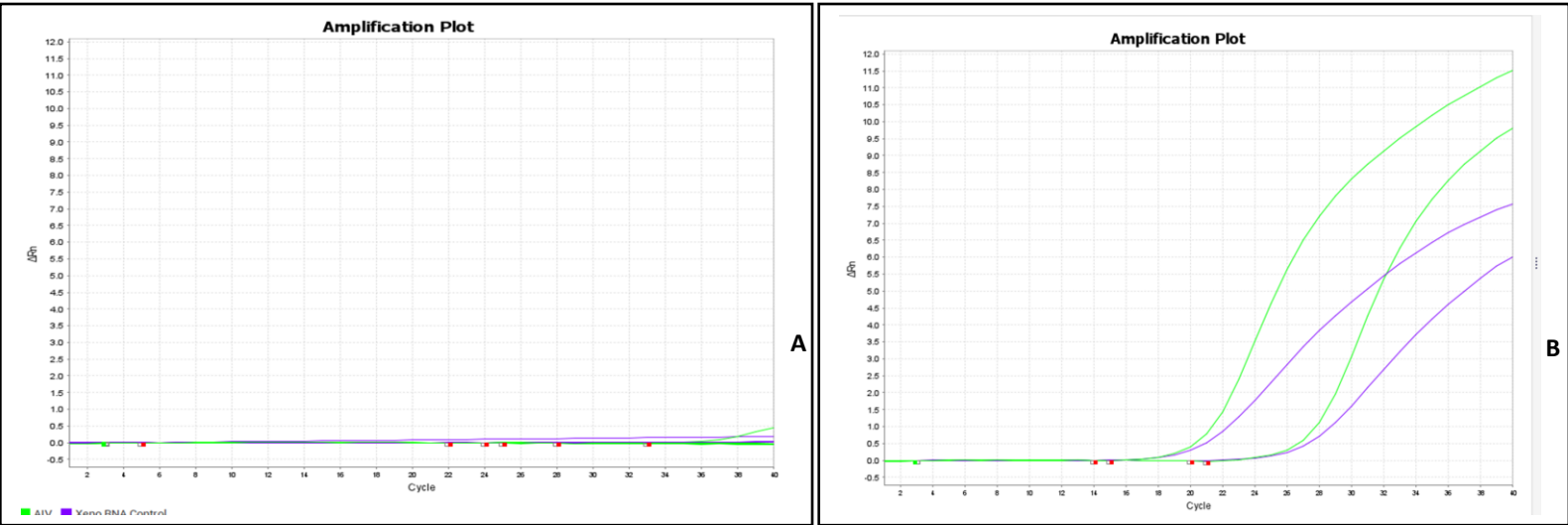
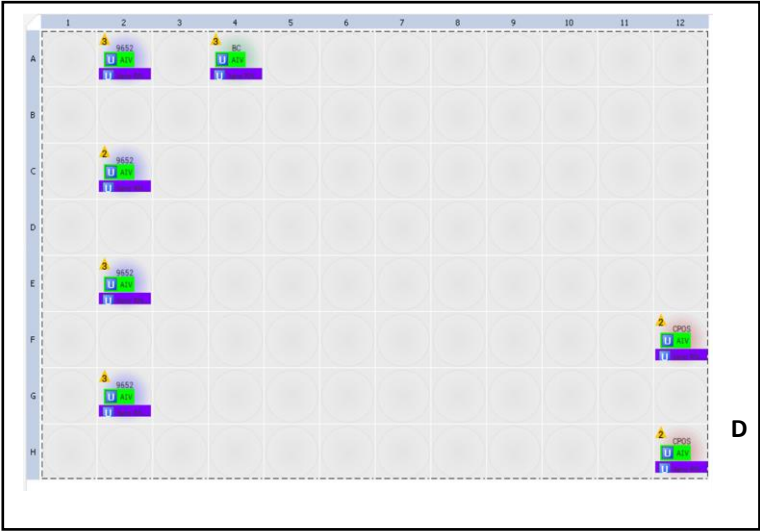
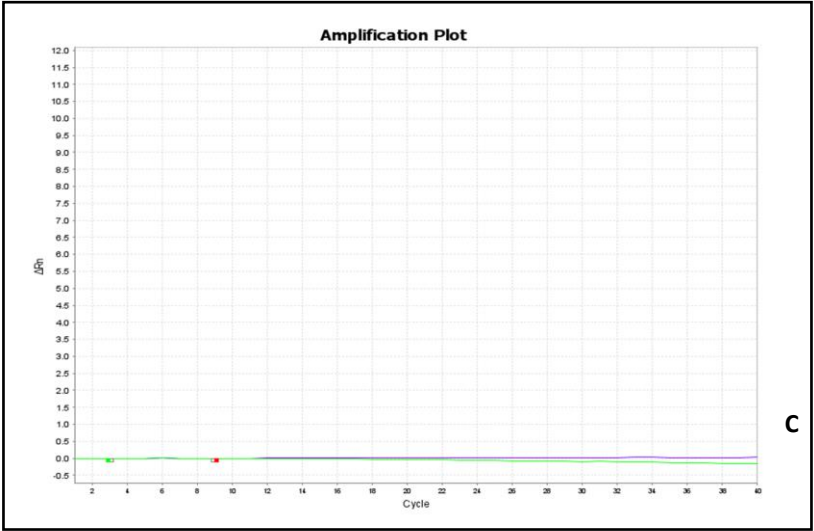


Figura 6: Amplificación QuantStudio.

Figura 7: Interfaz general de PCR





A. General, B. Controles positivos C. Muestras y D. Blancos

5. RESULTADOS

Se recolectaron y analizaron un total de 24 muestras, siendo todas negativas al PCR en tiempo real (Tabla 1). Se obtuvo una prevalencia del 0% en Influenza Aviar H5N1 en las 24 muestras de heces de lobos marinos analizadas, provenientes desde el mercado de Angelmó. 10 muestras fueron recolectadas en el mes de abril y 14 muestras en el mes de mayo (Tabla 1).

Tabla 1: Resultados qPCR muestra heces de lobos marinos.

Día muestreo	N.º muestra	Peso (g)	Concentración ng/uL	260/280	qPCR
12-abr-24	1	0,6	37	2,07	negativo
	2	0,7	193	2,32	negativo
	3	0,6	80,4	2,3	negativo
19-abr-24	4	0,16	231,1	2,3	negativo
	5	0,03	60,5	2,26	negativo
	6	0,04	284,6	2,31	negativo
	7	0,08	27,8	2,13	negativo
	8	0,09	86,9	2,25	negativo
26-abr-24	9	0,11	35,4	1,92	negativo
	10	0,1	24,6	1,74	negativo
03-may-24	11	0,1	35	1,83	negativo
	12	0,1	42	1,7	negativo
	13	0,12	17	1,62	negativo
	14	0,11	19	1,69	negativo
10-may-24	15	0,13	361,4	2,33	negativo
	16	0,06	37,9	2,19	negativo
	17	0,08	95,6	2,29	negativo
	18	0,09	53,5	2,23	negativo
17-may-24	19	0,11	114,3	2,26	negativo
	20	0,1	115,5	2,7	negativo
24-may-24	21	0,11	20,6	2,16	negativo
	22	0,09	180,2	2,24	negativo
	23	0,08	72,7	2,2	negativo
	24	0,07	19,3	2,15	negativo

Tabla 2: Medidas estadísticas de la concentración ng/ul y relación 260/280.

	Promedio	D. estándar	Mediana
Concentración ng/ul	93,55	92,29	57
260/280	2,13	0,26	2,22

6. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se realizaron análisis de heces de lobos marinos, en las que se efectuaron técnicas moleculares para hallar presencia de material genético del virus causante de gripe aviar. Los resultados indicaron en la totalidad de las muestras fueron negativas. Esto nos podría indicar que los lobos marinos que concurren en Angelmó no son portadores H5N1. Sin embargo, al limitarnos a muestrear individuos que estaban presentes en cierto rango horario del día, nos excluye la totalidad de individuos presentes esporádicamente dentro del sector, para así haber podido catalogar como zona libre de H5N1 entre los meses de abril y junio. Por lo tanto, en vez de declarar que lobos marinos de Angelmó están libres de H5N1, la expresión más correcta es catalogar las muestras tomadas, como exentas de H5N1.

Según registros del Favet, institución encargada del diagnóstico molecular de individuos concordantes a H5N1, junto a Sernapesca, la situación país ha mejorado con respecto a años anteriores. Es decir, el varamiento de individuos en las costas de nuestro país ha disminuido, evento característico a con respecto a las sospechas de H5N1. De hecho, el año 2023 desde enero-mayo, se registraron 12.258 individuos varados y en el presente año 2024, entre los mismos meses se registró una cifra de 1.289 ejemplares encallados. La disminución de los sucesos típicos característicos de la enfermedad nos podría indicar una cierta disminución en la prevalencia de H5N1, por con siguiente, una relación en la negatividad del total de muestras tomadas en nuestro estudio. Es difícil hacer un seguimiento por biología molecular en estos individuos, ya que cuando se identifica un ejemplar varado se prosigue con la eutanasia y un posterior traslado a una fosa sanitaria, no realizándose ningún tipo de toma de muestra para diagnóstico, a menos que el individuo varado sea una especie sin historial de H5N1 anteriormente en la región. (SERNAPESCA, 2024).

Según Ulloa et al. (2023) distintos factores pueden alterar la positividad de H5N1, entre ellos, condiciones ambientales, patogénesis del virus, así como, la llegada del virus hacia los tejidos relacionados con la muestra extraída, en este caso ha extensiones digestivas como estómago, intestinos o recto. Según Postel et al. (2021) la ingesta oral de agua, heces o animales infestados, podría ser la principal forma de vía de entrada al organismo, sin embargo, cargas virales de animales contagiados se destacan

principalmente tejidos cerebrales y en menor cantidad en muestras de pulmón, hisopados nasales e hisopados rectales. Los dos últimos son la forma más frecuente de métodos diagnóstico en individuos in vivo. Se recomienda tomar muestras de líquido cefalorraquídeo, además de porciones de cerebro y cerebelo para determinar una cuantificación mucho mayor. En base a estos antecedentes, si hubiésemos logrado analizar alguno de estos tejidos, quizá nuestros resultados serían diferentes, o bien no. Como antes se mencionó la transmisión mediante ingesta oral es la hipótesis que más fuerza ha tomado en lobos marinos debido a que las regiones que poseen un hábitat en donde las aves y los lobos marinos se benefician de los mismos recursos alimenticios se relacionan con la mayor cantidad de animales catalogados con H5N1. Así mismo, el propio consumo de aves enfermas por parte de lobos marinos se describe por Gamarra-Toledo et al. (2023). Nuestra región posee la mayor cantidad de población de lobos marinos a lo largo del país y tiene hábitats compuestos por lobos marinos y aves, sugiriendo la posibilidad de contagio como se mencionó anteriormente.

Sitios como Isla Metalqui, Dehui e Isla Guafo, serían de gran importancia mantener en un seguimiento más profundo, por un lado, Isla Metalqui y Dehui poseen una gran cantidad de lobos marinos, destacando la Isla Metalqui con una cantidad estimada de 19.000 individuos según el censo realizado por Oliva et al. (2019). Por otro lado, Isla Guafo, además de presentar una gran cantidad de población de lobos marinos, es destacada por su gran biodiversidad, indicada como sitio prioritario de la conservación de la región de los Lagos. Esta isla es señalada como el sitio de alimentación y crianza principal del hemisferio sur para la ballena azul (*Balaenoptera musculus*), asimismo, se establece la colonia reproductiva de aves migratorias más importante del mundo entre los meses de noviembre y marzo, más aún cuando aves migratorias se indican como el principal vector de la enfermedad. Además, posee en su territorio especies destacadas en peligro crítico como el Chungungo (*Lontra felina*) y la ballena franca (*Eubalaena australis*) (Seguel, 2018). El lobo marino presenta una de las colonias reproductivas más importante en la Isla Guafo con un aproximado de 5800 ejemplares, además estos forman parte de la dieta de distintos depredadores importante de la zona como lo es la orca (*Orcinus orca*), la cual se destaca en la zona durante el verano (Seguel y Pavés, 2018; WWF, 2020). Se sugiere vigilar de manera activa o pasiva el virus de influenza

aviar H5N1 en región de los Lagos debido a su importancia en el desencadenamiento de grandes cantidades de contagios, además de convertirse en una endemia en la fauna. Es de vital importancia prevenir posibles brotes y proteger la salud pública del virus.

7. CONCLUSIÓN

A modo de cierre, se realizó una investigación correspondiente a un estudio de tipo observacional longitudinal prospectivo analítico, desarrollando muestreos entre los meses de abril y mayo de heces frescas de lobo marino común (*Otaria flavescens*), categorizándolas como muestras ambientales a conveniencia. Se obtuvo en total 24 muestras de fecas, en las cuales se realizó un aislamiento del material genético, además, de un análisis mediante pruebas moleculares con el fin de identificar H5N1 (PCR en tiempo real), obteniendo como resultado negativo la totalidad de las muestras. Finalmente, se presentaron los resultados organizados en tablas, ordenados por números de muestras y fecha de extracción. Los resultados negativos de igual forma sugieren la importancia de seguir monitoreando la presencia de este subtipo de virus en la población, así como implementar medidas preventivas para prevenir la propagación de la enfermedad. Finalmente, podemos concluir que las muestras tomadas, están exentas de H5N1, pero no podemos concluir que el mercado de Angelmó es libre de H5N1.

REFERENCIAS

- Arancibia J. (2022). El Lobo marino común, *Manejo a nivel nacional en la pesca artesanal y su relación con la Marine Mammal Protection Act de Estados Unidos de Norteamérica*. Biblioteca del Congreso Nacional.
https://www.bcn.cl/asesoriasparlamentarias/detalle_documento.html?id=80951
- Aqua. (2020). *Pesca artesanal: El eterno problema de la interacción con el lobo de mar*. Aqua.cl. Publicado el 19 de agosto del 2020. <https://www.aqua.cl/reportajes/pesca-artesanal-el-eterno-problema-de-la-interaccion-con-el-lobo-de-mar/#>
- AVMA. (2025). *Avian influenza virus type A (H5N1) in U.S. dairy cattle*
<https://www.avma.org/resources-tools/animal-health-and-welfare/animal-health/avian-influenza/avian-influenza-virus-type-h5n1-us-dairy-cattle>
- Bello R. (2018). *Guía de campo área la necropsia y muestreo biológico de lobos marinos*. <https://www.minam.gob.pe/comuma/wpcontent/uploads/sites/106/2018/08/GUIA-DE-CAMPO-LOBOS.pdf>
- Galaxia Cortés-Hinojosa, Bethany Doescher, Michael Kinsel, John Lednicky, Julia Loeb, Thomas Waltzek, and James F. X. Wellehan. (2016) "Coinfection of californian sea lion adenovirus 1 and a novel polyomavirus in a Hawaiian monk seal (NEOMONACHUS Schauinsland)," *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 47(2), 427 - 437.
<https://doi.org/10.1638/2014-0252.1>
- Gallo-Reynoso y J Maravilla M. (2000). Familia Otariidae. S Álvarez-Castañeda S., Patton JL. (Eds). *Mamíferos del noroeste de México (II, pp.775-780)*. Centro de Investigaciones Biológicas del noroeste.
- Gamarra-Toledo, V., Plaza, P. I., Gutiérrez, R., Inga-Díaz, G., Saravia-Guevara, P., Pereyra-Meza, O....Lambertucci, S. A. (2023). Mass Mortality of Sea Lions Caused by Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Virus. *Emerging Infectious Diseases*, 29(12), 2553-2556. <https://doi.org/10.3201/eid2912.230192>.
- García, J., Santana, Z., Zumalacárregui, L., Quintana, M., González, D., Furrázola, G., y Cruz, O. (2013). *Estrategias de obtención de proteínas recombinantes en Escherichia coli*.

Vaccimonitor, 22(2), 30-39. Recuperado en 07 de noviembre de 2023, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025028X2013000200006&lng=es&tlng=es.

Godoy, M., Oca, M.M.d., Caro, D., Pontigo, J.P., Kibenge, M., Kibenge, F. (2023). *Evolution and Current Status of Influenza A Virus in Chile: A Review*. *Pathogens*, 12, 1252. <https://doi.org/10.3390/pathogens12101252>

González-Fuentes M., Fadua I., Fernández F., Villanueva M, Ulloa J. y Fernández H. (2010). *Especies de la familia Enterobacteriaceae en heces de lobo marino común, Otaria flavescens establecido en el río Valdivia*. *Revista de biología marina y oceanografía*, 45(2), 331-334. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-19572010000200015>

Guarner, F. (2007). Papel de la flora intestinal en la salud y en la enfermedad. *Nutrición Hospitalaria*, 22(Supl. 2), 14-19. Recuperado en 08 de diciembre de 2023, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0212-16112007000500003&lng=es&tlng=es.

Günther, A., Krone, O., Svansson, V., Pohlmann, A., King, J., Hallgrimsson, G....Harder, T. (2022). Iceland as Stepping Stone for Spread of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus between Europe and North America. *Emerging Infectious Diseases*, 28(12), 2383-2388. <https://doi.org/10.3201/eid2812.221086>

Hermosilla C., Hirzmann J., Silva R., Scheufen S., Prenger-Berninghoff E., Ewers C., Häussermann V., Försterra G., Poppert S. y Taubert A. (2018) *Gastrointestinal Parasites and Bacteria in Free-Living South American Sea Lions (Otaria flavescens) in Chilean Comau Fjord and New Host Record of a Diphyllbothrium scoticum-Like Cestode*. Volumen 5 -2018 <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00459>

Hucke-Gaete R., Ruiz J. (2010). *Guía de campo de las especies de aves y mamíferos marinos del sur de Chile*.

https://www.researchgate.net/publication/258121263_Guia_de_campo_de_las_aves_y_mamiferos_marinos_del_sur_de_Chile

Jara, A. (2017). *Caracterización de Enterobacterias productoras de betalactamas de amplio espectro en heces de Lobo marino común (Otaria flavescens) de una colonia urbana de la Región de los Ríos, Chile*. [Memoria de Título presentada como parte de los requisitos para optar al Título de Médico Veterinario] Repositorio Institucional.

<http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2017/fvj.37c/doc/fvj.37c.pdf>

Kandeil, A., Patton, C., Jones, J. C., Jeevan, T., Harrington, W. N., Trifkovic, S., Seiler, J. P., Fabrizio, T., Woodard, K., Turner, J. C., Crumpton, J. C., Miller, L., Rubrum, A., DeBeauchamp, J., Russell, C. J., Govorkova, E. A., Vogel, P., Kim-Torchetti, M., Berhane, Y., Stallknecht, D., Webby, R. J. (2023). *Rapid evolution of A(H5N1) influenza viruses after intercontinental spread to North America*. *Nature communications*, 14(1), 3082. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38415-7>

Medina-Vogel, G. (2010). *Ecología de enfermedades infecciosas emergentes y conservación de especies silvestres*. *Archivos de medicina veterinaria*, 42(1), 11-24.

<https://dx.doi.org/10.4067/S0301-732X2010000100003>

Ministerio de Economía, Fomento y Turismo (2021). Leyes N° 1980 y N° 20.657. En Biblioteca del Congreso Nacional. https://www.subpesca.cl/portal/615/articles-109696_documento.pdf

Oliva D., Durán L.R., Sepúlveda M., Cárcamo D., Pizarro M., Anguita C., Santos M., Canto A., Herrera P., Muñoz L., Orellana M. y Vásquez P. (2019) *Estimación poblacional de lobos marinos e impacto de la captura incidental*. Proyecto FIPA 2018-54, Pre-informe.

https://www.subpesca.cl/portal/617/articles-105741_documento.pdf

OMS. (2020). Zoonosis. Publicado el 29 de julio del 2020. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/zoonoses>

- Otzen T. y Manterola C. (2017) Sampling Techniques on a Population Study. *International Journal of Morphology*, 35(1), 227-232. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022017000100037>
- Pavés H., Tobar C., Santibáñez A., Meier D., Miranda-Urbina D. y Olivera F. (2020). *Patrones de avistamientos y distribución de mamíferos marinos en el litoral centro-sur de Chile. Revista de Biología Marina y Oceanografía*, Vol. 55, N°3: 225-237. <https://doi.org/10.22370/rbmo.2020.55.3.2587>
- Postel A., King J., Kaiser FK., Kennedy J., Lombardo MS., Reineking W. Becher, P. (2022). Infections with highly pathogenic avian influenza A virus (HPAIV) H5N8 in harbor seals at the German North Sea coast, 2021. *Emerging Microbes & Infections*, 11(1), 725–72 <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2043726>
- Qiagen. (2022). *RNeasy PowerFecal Pro-Kit* <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/dna-rna-purification/rna-purification/microbial-rna/rneasy-powerfecal-pro-kit>
- Salgado D., Cárdenas R., (17 enero de 2022). Lobo marino muerde a trabajador en Mercado de Angelmó: piden precaución a visitantes. *Biobiochile.cl* <https://www.biobiochile.cl/especial/aqui-tierra/noticias/2022/01/17/lobo-marino-muerde-a-trabajador-en-mercado-de-angelmo-llaman-a-la-precaucion-de-visitantes.shtml>
- Sanguinetti, M. Cid-Aguayo B, Guerrero A., Durán M, Gomez-Uchida D. y Sepúlveda M. (2021) *Fishers' perception of the interaction between the South American sea lions and the Chinook salmon fishery in southern Chile. Scientific Reports*, Vol.11 (1), 1-3. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-93675-x>
- Seguel, Mauricio y Pavés, H (2018). Sighting patterns and habitat use of marine mammals at Guafo Island, Northern Chilean Patagonia during eleven austral summers. *Revista de*

biología marina y oceanografía, 53(2), 237-250.

<https://dx.doi.org/10.22370/rbmo.2018.53.2.1296>

Sturm N., (2011) *Detección de los enteropatógenos Cryptosporidium sp. y Salmonella entérica en Pinnípedos de Chile*. [Memoria para optar al Título Profesional de Médico Veterinario Departamento de Medicina Preventiva Animal, Universidad de Chile]. Repositorio Institucional. <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/131473>

Subpesca. (2019). *Ultrasonido ahuyenta a lobos marinos en pruebas preliminares dispuestas por Subpesca*. Subpesca.cl. Publicado el 17 de mayo de 2019.

<https://www.subpesca.cl/portal/617/w3-article-104301.html>

Ulloa M., Fernández A., Naomi Ariyama, Ana Colom-Rivero, Carlos Rivera, Paula Nuñez, Paola Sanhueza, Magdalena Johow, Hugo Araya, Juan Carlos Torres, Paola Gomez, Gabriela Muñoz, Belén Agüero, Raúl Alegría, Rafael Medina, Víctor Neira & Eva Sierra (2023) Mass mortality event in South American sea lions (*Otaria flavescens*) correlated to highly pathogenic avian influenza (HPAI) H5N1 outbreak in Chile, *Veterinary Quarterly*, 43:1, 1-10, <https://doi.org/10.1080/01652176.2023.2265173>

VisitChile, (23 octubre de 2019). *Angelmó*. VisitChile.com.

<https://www.visitChile.com/es/blog/angelmo/>

WWF Chile (2020). *Guafo: Riqueza biológica y cultural para la conservación marina en la Ecorregión Marina Chiloense*. WWF Chile. Santiago.

https://www.flac.awsassets.panda.org/downloads/guafo_riqueza_biol%C3%B3gica_y_cultural_para_la_conservacion_en_la_ecorregion_marina_chiloense.pdf

Weinberger C., *El lobo marino común, Otaria flavescens, en Chile: distribución espacial, historia demográfica y estructuración genética*. [Tesis para optar el grado de doctora en Ciencias Biológicas, mención Ecología, Pontificia Universidad Católica de Chile].

Repositorio Institucional. <https://doi.org/10.7764/tesisUC/BIO/1816>

Ziehl, (2015) *E Programa de Posgrado en Ciencias de la Vida con orientación en Biología Ambiental Prevalencia de cuatro enfermedades infecciosas en lobo fino en Isla Guadalupe, México*. Repositorio Institucional
<https://cicese.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1007/658/1/242621.pdf>