



**UNIVERSIDAD
SAN SEBASTIAN**
VOCACIÓN POR LA EXCELENCIA

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

**CARACTERIZACIÓN HISTOPATOLÓGICA Y DETECCIÓN MEDIANTE
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL DE
VIRUS INFLUENZA AVIAR (H5N1), EN ÓRGANOS DE AVES MARINAS,
INGRESADOS A LA UNIDAD DE MORFOLOGÍA Y DIAGNÓSTICO,
ENTRE LOS AÑOS 2015 A 2025**

**MEMORIA DE TÍTULO COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA OPTAR AL TÍTULO
DE MÉDICO VETERINARIO**

Profesor guía: Dr. Frank Alexis Vera Otárola
Copatrocinador: Dr. Juan Pablo Pontigo Vásquez
Estudiante: Jessica Chueh Chueh

Puerto Montt, Chile

2025

DERECHOS DE AUTOR

© Jessica Chueh Chueh. 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

2025

HOJA DE CALIFICACIÓN



HOJA DE CALIFICACIÓN

En Puerto Montt, el 11 de julio, de 2025 los abajo firmantes, dejan constancia que el (la) estudiante Jessica Chueh Chueh de la carrera o programa de Medicina Veterinaria, ha aprobado la tesis o memoria de título para optar al título o grado académico de Médico Veterinario con una nota de 6,7

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Frank Vera".

Frank Vera

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Jazmín Muena".

Jazmín Muena

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Luis Miguel Flores".

Luis Miguel Flores

AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente el apoyo, paciencia, supervisión y ayuda de mi profesor guía, Frank, de mi profesor copatrocínador, Juan Pablo y de mi hada madrina, Jeraldine, creo que sin la ayuda de ellos no habría podido realizar este proyecto con tanta rigurosidad. Agradezco a mis amigas que han estado presentes en este proceso animándome y apoyándome en todo momento. También agradezco a mis mascotas y familia que me acompañan a la distancia y me motivan a continuar en este camino.

TABLA DE CONTENIDOS

DERECHOS DE AUTOR	i
HOJA DE CALIFICACIÓN	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Aves marinas en Chile	2
1.2. Migración aviar.....	2
1.3. Zoonosis.....	4
1.4. Enfermedades Virales	5
1.5. Newcastle	5
1.6. Influenza Aviar.....	6
1.6.1. Ciclo viral	6
1.6.2. Influenza Aviar en Chile	7
1.7. Métodos de diagnóstico	8
2. HIPÓTESIS	11
3. OBJETIVOS	12
4. MATERIALES Y MÉTODOS	13
4.1. Tipo de estudio.....	13
4.2. Especies presentes en el estudio.....	13
4.3. Criterios de inclusión y de exclusión	13
4.4. Necropsias y toma de muestras	14
4.5. Procesamiento de muestras de tejidos	15

4.6. Procedimiento de tinción.....	16
4.7. Análisis Histopatológico	16
4.7.1. Histoscore	16
4.8. Detección del agente a través de qPCR	16
4.9. Modelo estadístico	18
5. RESULTADOS	19
5.1. Objetivo I: Identificar hallazgos histopatológicos de virus de influenza aviar (H5N1), en órganos de aves marinas, ingresados a la Unidad de Morfología y Diagnóstico, entre los años 2015 a 2025.....	19
5.2. Objetivo 2: Describir hallazgos histopatológicos de virus de influenza aviar (H5N1), en órganos de aves marinas, ingresados a la unidad de Morfología y Diagnóstico, entre los años 2015 a 2025.....	21
5.2.1. Trastorno inflamatorio	21
5.2.2. Trastorno necrótico	26
5.2.3. Trastorno circulatorio	29
5.2.4. Trastorno degenerativo	32
5.2.5. Trastorno del crecimiento	33
5.3. Detectar mediante qPCR el virus de influenza aviar (H5N1), en órganos de aves marinas, ingresados a la Unidad de Morfología y Diagnóstico, entre los años 2015 a 2025.....	36
5.4. Asociar la presencia o ausencia de lesiones sugerentes de influenza aviar (H5N1) identificadas histopatológicamente, con la positividad o negatividad a la técnica qPCR, en órganos de aves marinas, ingresados a la Unidad de Morfología y Diagnóstico, entre los años 2015 a 2025	37
6. DISCUSIÓN	38
6.1. Objetivo I: Identificar hallazgos histopatológicos de virus de influenza aviar (H5N1), en órganos de aves marinas, ingresados a la Unidad de Morfología y Diagnóstico, entre los años 2015 a 2025.....	38
6.2. Objetivo 2: Describir hallazgos histopatológicos de virus de influenza aviar (H5N1), en órganos de aves marinas, ingresados a la unidad de Morfología y Diagnóstico, entre los años 2015 a 2025.....	39
6.3. Detectar mediante qPCR el virus de influenza aviar (H5N1), en órganos de aves marinas, ingresados a la Unidad de Morfología y Diagnóstico, entre los años 2015 a 2025.....	40

6.4. Asociar la presencia o ausencia de lesiones sugerentes de influenza aviar (H5N1) identificadas histopatológicamente, con la positividad o negatividad a la técnica qPCR, en órganos de aves marinas, ingresados a la Unidad de Morfología y Diagnóstico, entre los años 2015 a 2025	41
7. CONCLUSIÓN	43
8. BIBLIOGRAFÍA	44
9. ANEXOS.....	51
9.1. Anexo 1. Lista de verificación de necropsia, adaptado de “Clinical avian medicine” (Rae, 2006).	51
9.2. Anexo 2. Solicitud de necropsia USS.....	52
9.3. Anexo 3. Procedimientos técnicos de histología, adaptado de “Manual de procedimientos del laboratorio de histología veterinaria” (Muena y Vera, 2021).	53
9.4. Anexo 4. Coloración Núcleo-Citoplasmática, adaptado de “Manual de laboratorio de técnica histológica” (Poveda, 2023).	56
9.5. Anexo 5. Tablas de histoscore, adaptado por Gabriel Fernández (2024).	60
9.6. Anexo 6. Protocolo de extracción de ARN, adaptado de “E.Z.N.A.® FFPE RNA Kit” (Omega Bio-Tek, 2023).	62
9.7. Anexo 7. Protocolo para enzima M-MLV (Promega, 2024).	63
9.8. Anexo 8. Protocolo para el reactivo Briliant® II SYBR® Green qPCR Master Mix (Stratagene, 2007).	64
9.9. Anexo 9. Permiso uso de muestras de Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA).	66
9.10. Anexo 10. Permiso uso de muestras de Servicio Agrícola y Ganadero (SAG).	67
9.11. Anexo 11. Permiso uso de muestras de ONG Chiloé Silvestre.	68
9.12. Extracto del convenio SAG-USS CEREFAS.	69
9.13. Estadística órganos afectados y trastornos más frecuentes (inflamatorio y circulatorio).	70
9.14. Estadística infiltrado inflamatorio linfocitario y mixto.	71
9.15. Estadística especies más afectadas (<i>Spheniscus sp.</i> Y <i>Larus dominicanus</i>) y trastorno inflamatorio.	72

9.16. Estadística órganos más afectados (pulmón e intestino) y trastorno inflamatorio.....	73
9.17. Estadística especies más afectadas (<i>Spheniscus sp.</i> Y <i>Larus dominicanus</i>) y trastorno necrótico.	74
9.18. Estadística órganos más afectados (riñón e hígado) y trastorno necrótico.	75
9.19. Estadística órganos más afectados (pulmón y riñón) y trastorno circulatorio.....	76
9.20. Estadística órganos más afectados (hígado e intestino) y trastorno degenerativo.	77
9.21. Estadística órganos más afectados (hígado e intestino) y trastorno del crecimiento.	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de distribución del zarapito (<i>Numenius phaeopus</i>)	3
Figura 2. Simbología de colores de figura 1.....	4
Figura 3. Gráfico de cantidad de casos con trastornos por órgano.....	20
Figura 4. Distribución de órganos por tipo de infiltrado inflamatorio	21
Figura 5. Distribución del histoscore del trastorno inflamatorio por especie y órganos.....	23
Figura 6. Histoscore de inflamación en aves marinas según cada órgano.....	24
Figura 7. Trastornos inflamatorios en intestino y pulmón de aves marinas	25
Figura 8. Distribución del histoscore del trastorno necrótico por especie y órganos.....	27
Figura 9. Histoscore de necrosis en aves marinas según cada órgano.....	28
Figura 10. Órganos de aves marinas con lesiones necróticas	29
Figura 11. Histoscore de trastornos circulatorios en aves marinas según cada órgano.	30
Figura 12. Tejidos de pingüinos (<i>Spheniscus sp.</i>) con trastornos circulatorios ...	31
Figura 13. Histoscore de trastornos degenerativos en aves marinas según cada órgano	32
Figura 14. Órganos de pingüinos (<i>Spheniscus sp.</i>) con lesiones degenerativas..	33
Figura 15. Histoscore de trastornos del crecimiento en aves marinas según cada órgano	34
Figura 16. Intestinos de aves marinas con trastornos del crecimiento.....	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cantidad de órganos por trastornos sugerentes de IAAP	19
Tabla 2. Cantidad de tipos de infiltrados inflamatorios por órganos.....	20
Tabla 3. Frecuencias porcentuales y absolutas de casos con lesión inflamatoria, graduadas mediante histoscore, por órgano y especie afectada, en un total de 40 individuos	22
Tabla 4. Frecuencia absoluta y porcentual de casos con inflamación, según el grado y el órgano	24
Tabla 5. Cantidad de casos por grado de trastorno necrótico por órgano y especie	26
Tabla 6. Frecuencia absoluta y porcentual de casos con necrosis, según el grado y el órgano.....	28
Tabla 7. Frecuencia absoluta y porcentual de casos con trastorno circulatorio, según el grado y el órgano	29
Tabla 8. Frecuencia absoluta y porcentual de casos con trastorno degenerativo, según el grado y el órgano	32
Tabla 9. Cantidad de casos con trastorno del crecimiento según el grado y el órgano	33
Tabla 10. Resultados de la medición de concentración y pureza del ARN extraído	36
Tabla 11. Casos de diferentes especies y órganos con hallazgos histopatológicos que se sometieron a qPCR y sus respectivos resultados	37

RESUMEN

La influenza aviar de alta patogenicidad (IAAP) ha implicado un gran riesgo para la fauna, la salud pública y la economía, ya que está distribuida mundialmente gracias a las aves migratorias, es altamente contagiosa y mortal, afectando a aves de producción, aves silvestres y mamíferos. El objetivo de esta investigación fue caracterizar histopatológicamente y detectar mediante qPCR el virus de influenza aviar (H5N1), en órganos de aves marinas, ingresadas a la Unidad de Morfología y Diagnóstico entre los años 2015 a 2025. Para esto, se ocuparon muestras de tejidos obtenidos en necropsias y las que presentaron lesiones histopatológicas (evaluados con un histoscore para la graduación de las lesiones) características de influenza aviar se sometieron a qPCR para la confirmación diagnóstica del agente. Se analizaron 200 muestras correspondientes a 40 casos de diferentes especies de aves marinas, los órganos más afectados fueron el hígado y pulmón, con trastornos inflamatorios, necróticos y circulatorios. De todas las muestras con lesiones sugerentes de IAAP (44 muestras en total), se seleccionaron 13 muestras para realizar qPCR, pero todas resultaron negativas debido a una baja concentración y pureza de la extracción de ARN. Los hallazgos observados son concordantes con las lesiones descritas en literatura para IAAP, pero al no poder detectar el agente en qPCR limita la confirmación de este. La principal limitación fue la degradación del ARN por la conservación de las muestras en formalina por períodos prolongados y la posible falla en el partidor o técnica utilizada. Como conclusión, si bien las lesiones histopatológicas observadas eran sugerentes de IAAP, no se pudo confirmar la presencia del virus a través de qPCR, esto destaca la importancia de tener en consideración las variables que pueden disminuir la calidad del ARN y por ende, la eficacia de las pruebas moleculares.

Palabras claves: Influenza aviar, H5N1, zoonosis, aves marinas, histopatología, PCR.

ABSTRACT

The high pathogenic avian influenza (HPAIV) has posed a significant risk to fauna, public health and the economy due to its worldwide distribution via migratory birds. It is highly contagious and often fatal, affecting poultry, wild birds and mammals. The objective of this research was to perform histopathological characterization and detection of the avian influenza virus (H5N1) by qPCR in organs of seabirds submitted to the Morphology and Diagnostic Unit between 2015 and 2025. To detect the virus, tissue samples were obtained during necropsies and those that showed histopathological characteristics lesions (evaluated using a histoscore for lesion grading) of avian influenza were subjected to qPCR for diagnostic confirmation of the agent. A total of 200 samples from 40 cases of different seabird species were analyzed, the most affected organs were the liver and the lungs, presenting inflammatory, necrotic and circulatory disorders. From the 44 samples with lesions suggestive of HPAIV, 13 were selected for qPCR, but all tested negative due to low RNA concentration and purity. The histopathological findings were consistent with those described in the literature for HPAIV, but the inability to detect the virus by qPCR limited its confirmation. The main limitation was RNA degradation caused by prolonged formalin preservation and potential issues with the primers or technique used. In conclusion, although the histopathological lesions observed were suggestive of HPAIV, the presence of the virus could not be confirmed by qPCR. This highlights the importance of considering variables that may reduce RNA quality and consequently, the effectiveness of molecular tests.

Keywords: Avian influenza, H5N1, zoonosis, seabirds, histopathology, PCR.

1. INTRODUCCIÓN

La categoría de aves marinas engloba tanto a las aves que viven en el mar y las aves costeras, dentro de esto se encuentran las aves de orden Charadriiformes, Procellariiformes (aves pelágicas), Sphenisciformes, Phaethontiformes, Suliformes y Pelecaniformes. Estas aves han desarrollado una adaptación a la vida acuática y pelágica¹ (Hernández y Arroyo, 2024).

Paleczny et al. (2015) indican que, en los últimos años, la población de las aves marinas ha sufrido una gran disminución, la cual en un 69,7% se atribuye a diversas amenazas, las cuales son en su gran mayoría de origen antropogénico, como por ejemplo la degradación del hábitat, depredación por especies exóticas introducidas (principalmente gatos en islas) y también el cambio climático. Además, Boulinier et al. (2016) informan sobre el efecto de algunas enfermedades parasitarias e infecciosas de origen bacteriano, fúngico y viral, ya que las aves usualmente viven en poblaciones grandes y recorren largas distancias.

Algunos ejemplos que podemos encontrar dentro de estas enfermedades son, los endoparásitos tales como los cestodos, trematodos y nematodos (Amundson et al., 2016). Dentro de los ectoparásitos están las garrapatas, ácaros, pulgas y piojos (De Matos et al., 2020). Algunos de los patógenos fúngicos más importantes en las aves son, el *Aspergillus flavus*, *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans* (Mirhosseini y Khosravi, 2023). En cuanto a enfermedades bacterianas, Khan et al. (2019) mencionan que las principales enfermedades son, la cólera aviar (*Pasteurella multocida*), la enfermedad de Lyme

¹ Pelágica: Dicho de zona marina: De alta mar.

(*Borrelia burgdorferi*), el botulismo aviar (*Clostridium botulinum*) y la clamidiosis (*Chlamydia psittaci*).

1.1. Aves marinas en Chile

En las costas de Chile se suelen encontrar una diversidad amplia de especies de aves marinas, lo que ha convertido a la zona en un área de interés para la conservación y estudio de estas. Algunas especies representativas son, el Chorlo chileno (*Charadrius modestus*), Albatros de ceja negra (*Thalassarche melanophrys*), Pingüino de Humboldt (*Spheniscus humboldti*) y Magallánico (*Spheniscus magellanicus*), Ave del trópico de pico rojo (*Phaethon aethereus*), Piquero de Humboldt (*Sula variegata*), Pelícano de Humboldt (*Pelecanus thagus*), Gaviota dominicana (*Larus dominicanus*) y Zarapito (*Numenius phaeopus*). A excepción del Zarapito, que es una especie visitante², todas las aves mencionadas son residentes³ en Chile (Martínez-Piña, 2023).

1.2. Migración aviar

“La migración aviar se define como el movimiento periódico de individuos entre un sitio (áreas de reproducción) y otro (áreas de invernada o descanso)” (Petracci et al., 2005, p. 2).

Muchas especies de aves han desarrollado este comportamiento como un mecanismo biológico de sobrevivencia y adaptación a las adversidades estacionales del medio ambiente, tal como la disponibilidad de alimento. Este proceso es altamente demandante de energía para las aves, ya que recorren largas distancias y dependen de las condiciones climáticas, por lo que es fundamental que cuenten con una gran disponibilidad de alimento (Myers et al., 1987; Petracci et al., 2005).

Las migraciones se producen en tres sentidos, altitudinal, como la Tortolita cordillerana (*Metriopelia melanoptera*), longitudinal (aves que migran desde lugares interiores hacia la zona costera de un mismo continente) y latitudinal (de norte a sur), este último puede

² Visitante: Una especie que no se reproduce en Chile, pero hay antecedentes suficientes como para asegurar que en cierta época del año y en cierto rango o hábitat estará presente.

³ Residente: Una especie que se reproduce en Chile, aunque realice migraciones estacionales.

ser de corto, mediano o largo alcance, como por ejemplo algunas gaviotas (Familia Laridae), gavotines, zarapitos (Familia Scolopacidae), entre otros (Tala, 2006).

Existen diferentes sistemas de migración, pero el más amplio en el hemisferio austral es el sistema migratorio austral, este consiste en que las aves nidifican en áreas templadas de Sudamérica y luego, durante el invierno austral migran en dirección al norte, hacia áreas tropicales como la Amazona (Chesser, 1994). Se reconocieron siete rutas migratorias en el sistema migratorio austral, las tres principales son, desde los Andes del sur de la Patagonia y Tierra del Fuego hasta Bolivia y Perú; desde el este de Tierra del Fuego y sur de Patagonia hasta Uruguay, Paraguay y sudeste de Brasil; desde el centro y occidente de la Patagonia hasta Mato Grosso, Bolivia y Paraguay (Caplonch, 2018).

Uno de los mejores ejemplos de migración aviar es el zarapito (*Numenius phaeopus*), ya que es una especie migratoria que recorre prácticamente todo el mundo y solo anida y se reproduce en grupos pequeños o parejas solitarias desde mayo hasta agosto en los países de Estados Unidos, Rusia, Bielorrusia, Islas Feroe, Estonia, Groenlandia, Suecia, Letonia, Noruega e Islandia (International Union for Conservation of Nature [IUCN], 2016).

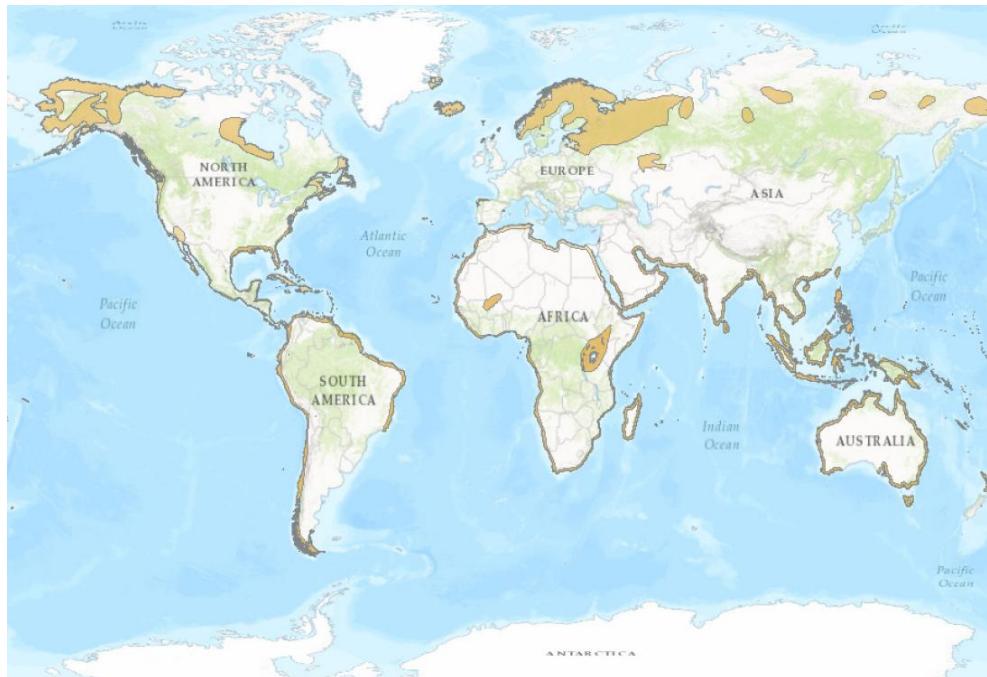


Figura 1. Mapa de distribución del zarapito (*Numenius phaeopus*). Fuente: IUCN (2016).

Range

-  Extant & Vagrant (non-breeding)
-  Extant & Vagrant (seasonality uncertain)
-  Extant (breeding)
-  Extant (non breeding)
-  Extant (passage)
-  Extant (seasonality uncertain)

Figura 2. Simbología de colores de figura 1. Fuente: IUCN (2016).

1.3. Zoonosis

Según la Real Academia Española (RAE) el término zoonosis significa “Enfermedad o infección que se da en los animales y que es transmisible a las personas en condiciones naturales” (2023).

Chomel (2009) menciona que existen cuatro clasificaciones de zoonosis, estas son:

-Ortozoonosis: Es la zoonosis directa, se transmite por contacto directo, mediante un vector o vehículo desde un vertebrado infectado a un vertebrado susceptible. La mayoría de estos se transmite al humano por contacto directo con un animal infectado, el mejor ejemplo es la Rabia.

-Ciclozoonosis: Esta requiere más de una especie de vertebrado, pero no necesita a un hospedero invertebrado para desarrollar su ciclo, por lo general estas enfermedades son causadas por cestodos, como la *Taenia solium*.

-Ferozoonosis: También conocida como metazoonosis, esta necesita vectores invertebrados tales como mosquitos (Encefalitis equina), pulgas (Peste) y garrapatas (Enfermedad de Lyme) para poder transmitir enfermedades virales o bacterianas a hospederos vertebrados.

-Saprozoonosis: Este tipo de zoonosis se puede desarrollar en un hospedero vertebrado o en el medio ambiente, en objetos inanimados como suelo, plantas, materia orgánica, etcétera. Una de las enfermedades más conocidas que se encuentran dentro de esta clasificación es la listeriosis.

1.4. Enfermedades Virales

Las enfermedades más comunes y de denuncia obligatoria (EDO) de etiología viral que afectan a las aves incluyen a la Bronquitis infecciosa aviar (*Coronaviridae*), Newcastle (*Paramyxoviridae*) e Influenza Aviar (*Orthomyxoviridae*) (Decreto 389, 2019). Además, tienen una gran importancia económica y de salud pública a nivel global, sobre todo para las industrias avícolas, dado que estos virus tienen una gran morbilidad, mortalidad y un alto potencial zoonótico. Todo esto hace que el estudio de estas enfermedades sea de suma importancia para lograr un control, prevención y tratamiento de estas (Jordan et al., 2018). Sobre todo, en el caso de la influenza aviar al ser un virus con gran capacidad de mutación y recombinación, empieza a afectar a otros hospederos mamíferos (Korteweg y Gu, 2008) como lobo marino común (*Otaria flavescens*), chungungo (*Lontra felina*) y gato de Geoffroy (*Leopardus geoffroyi*), estos fueron los mamíferos reportados en el último brote de H5N1 en Chile (Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura [SERNAPESCA], 2023; Soto et al., 2023). Además, afecta negativamente tanto al comercio avícola como a los consumidores, sobre todo porque la proteína animal más consumida en Chile es el pollo y se ha estimado que las pérdidas (días de trabajo, producción y gastos médicos) en Estados Unidos es de 100 a 200 mil millones de dólares y la inversión mínima para la prevención y control de esta enfermedad es de 47,2 millones de dólares (Almeida, 2006).

1.5. Newcastle

El agente etiológico de esta enfermedad es el virus envuelto, de genoma de ácido ribonucleico (ARN) Paramixovirus aviar serotipo 1, perteneciente a la familia *Paramyxoviridae*. Algunos de los signos clínicos que se puede presentar son, disminución de la producción de huevos, cuadros neurológicos y distrés respiratorio, estos pueden ser agravados por estrés u otras infecciones. Junto con su diagnóstico diferencial, la influenza aviar, son unos de los mayores problemas en la producción avícola, debido a que ambos generan una alta tasa de mortalidad en las aves (Alexander, 2000; Leighton y Heckert, 2007).

1.6. Influenza Aviar

El virus de la influenza A, subtipo H5N1 es un virus perteneciente a la familia *Orthomyxoviridae* (de los cuales se conocen cuatro tipos A, B, C y D) envuelto y con genoma ARN (Contreras y Llanos, 2023). Las aves acuáticas silvestres y costeras son los principales hospederos y reservorios naturales de los virus de la influenza A (Lang et al., 2016). Este virus es altamente patógeno y es una amenaza tanto para las aves como para los mamíferos, incluyendo a los humanos de manera esporádica, causando impactos considerables en la agricultura, la economía y la salud pública (Youvan, 2024).

De acuerdo con Spackman (2020) uno de los primeros casos registrados del virus de la influenza A se detectó en Italia en 1870, en un ave de corral. Los métodos de prevención para las aves de producción (patos y pollos) son diversos, como por ejemplo evitar completamente el contacto con aves infectadas o aves silvestres en general, la bioseguridad y la vacunación, donde estos dos últimos tienen como objetivo la eliminación del virus.

Se conocen dos categorías del virus de la influenza aviar y se clasifican según la gravedad del cuadro, se encuentra la Influenza Aviar de Baja Patogenicidad (IABP) y la Influenza Aviar de Alta Patogenicidad (IAAP), este último se caracteriza por ser más agresivo, poder ser transmitido a otras especies tales como los mamíferos que se mencionaron anteriormente (Oficina de Estudios y Políticas Agrarias [ODEPA], 2024).

Contreras y Llanos (2023) señalan que H5N1 es un tipo de IAAP, dado a que tiene un mayor poder de contagio, causa una enfermedad grave en las aves, una rápida propagación y por consiguiente una alta tasa de morbilidad y mortalidad.

Los signos clínicos que comúnmente se presentan en la influenza aviar son, diarrea, muerte súbita y cuadros neurológicos como la ataxia, debilidad, postura anormal, entre otros. Actualmente no existe un tratamiento para esta enfermedad y se recomienda la eutanasia (Hedley, 2015).

1.6.1. Ciclo viral

El virus de la influenza A al tener un genoma ARN segmentado con capacidad de codificar diez proteínas virales, permite que tenga un alto índice de mutación y que dos virus

puedan combinar segmentos de ARN ocasionando variantes con diferentes virulencias en distintas especies animales. Dentro de las diez proteínas virales, dos son glicoproteínas que se proyectan en la membrana fosfolipídica del virus, estas son la hemaglutinina (H) y la neuraminidasa (N) (Herrero-Uribe, 2008; Korteweg y Gu, 2008)

La función de la hemaglutinina es identificar y unirse a los receptores de ácido siálico presentes en las células de los hospederos para así comenzar la infección. Junto con la neuraminidasa ejercen un rol importante en la patogenicidad, virulencia y penetración del virus (AbuBakar et al., 2023).

El virus en las aves se replica a nivel renal, pulmonar, encéfalo (Padilla et al., 2004) y gastrointestinal, por lo que se elimina una gran carga viral en las heces, la mutación y recombinación del virus se produce en lugares donde aves silvestres y otros animales (aves de corral principalmente) tienen contacto, comparten alimento y hábitat (Herrero-Uribe, 2008).

1.6.2. Influenza Aviar en Chile

El primer registro en Chile de brote de IAAP ocurrió con el subgrupo H7N3 en el año 2002, en una avícola ubicada en la comuna de San Antonio (V región), el cual tuvo una mortalidad del 11,52% de las aves de los planteles desde el 25 de marzo hasta el 31 de mayo. El brote más reciente en el territorio fue con el subgrupo H5N1 de linaje euroasiático, este se ha diseminado por todo el mundo debido a las aves migratorias, inició a fines del 2020 desde Asia Central hacia Europa, África, Oriente medio y Asia Oriental. Luego a finales del 2021 el virus llegó al continente americano, inicialmente afectando a Estados Unidos y Canadá. Finalmente, en 2022 el virus empezó a desplazarse (como resultado de las rutas migratorias de las aves) hacia el hemisferio sur, pasando por México, Centroamérica y Sudamérica, particularmente todo el territorio chileno se vio afectado, desde Arica hacia el sur (Max et al., 2006; ODEPA, 2024).

En cuanto al brote del 2002 en Chile, inicialmente se trataba de un IABP que, luego debido a una recombinación, mutó a IAAP. Gracias a esto, Chile fue el primer país en reportar un caso de IAAP en América del Sur, lo que llevó al Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) a implementar un programa de vigilancia para aves silvestres y de corral, este consiste en que se debe notificar al SAG la presencia de un ave enferma o muerta para que se

realice un aislamiento y detección viral mediante muestras de sangre y torulados de cloaca y tráquea (Mathieu et al., 2015).

Desde fin de año del 2022 hasta el primer semestre del 2023 ocurrió el brote más reciente de IAAP en el país, este brote fue mucho más agresivo, masivo y mortal que el primero. Afectó a aves de traspasio, planteles avícolas de pavos, gallinas de engorda y ponedoras, aves silvestres, mamíferos marinos y humanos. Los casos que más destacaron fueron, el primer hallazgo positivo en un lobo marino y el primer caso humano positivo a la enfermedad, siendo el tercer caso en humanos en el continente americano (entre los años 2022-2023). Desde el año 2003 a nivel mundial se han reportado 873 casos de humanos infectados por H5N1 con una mortalidad de 458 de ellos, en humanos esta enfermedad comúnmente se transmite por contacto directo con animales muertos o enfermos, puede ser asintomática o presentar síntomas leves como fiebre y tos, pero evoluciona rápidamente a una neumonía y en casos más graves ocasiona la muerte (ODEPA, 2024; Organización Mundial de la Salud [OMS], 2023).

1.7. Métodos de diagnóstico

Para llegar a precisar lesiones compatibles con la enfermedad o directamente identificar el agente etiológico que causó o está causando el cuadro, podemos ocupar diferentes pruebas:

1) Necropsia: Las necropsias, evaluaciones de las lesiones macroscópicas e inspección de los órganos es algo rutinario y primordial en la mayoría de los casos clínicos dentro de la medicina veterinaria, gracias a esto se pueden observar lesiones características de ciertas enfermedades, obtener muestras de tejidos y órganos. Las lesiones macroscópicas que se pueden encontrar son, neumonía, hemorragia y edema severa en pulmones, edema cerebral, hemorragia y necrosis de las placas de Peyer (intestino delgado), focos necróticos en corazón y ocasionalmente en hígado y riñón, entre otros (Majó y Dolz, 2010).

2) Histopatología: Luego de la obtención de muestras de tejidos que presenten lesiones o que se conozca donde se producen lesiones características de ciertas enfermedades o donde se produzca la replicación viral, se recomienda hacer histopatología para asociar el agente infeccioso con las lesiones existentes, orientar patologías de difícil diagnóstico

clínico y para confirmar la etiología en las patologías o enfermedades en las que se producen lesiones representativas. Los hallazgos que se pueden observar con la tinción de Hematoxilina-Eosina (HE) son, células apoptóticas (por inflamación, edema o hemorragia), inflamación y/o necrosis multifocal en varios órganos como el páncreas, corazón, riñón, cerebro y pulmones (Padilla et al., 2004; Swayne y Pantin-Jackwood, 2008).

3) Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR): Esta fue una de las primeras pruebas que se empleó para diagnosticar el virus de la influenza aviar en brotes, vigilancias e investigaciones, dado a que es rápida, asequible, cuantitativa y tiene una alta sensibilidad, además el virus es inactivado en el procesamiento de la muestra, por lo que lo que esta prueba entrega una bioseguridad al personal y al ambiente. Se debe tener en cuenta que, con cepas nuevas, el qPCR puede emitir falsos negativos (Spackman, 2020).

4) Enzimoinmunoanálisis de adsorción (ELISA): La técnica de ELISA ha ido incrementado su uso en el último tiempo, gracias a su eficiencia. Este detecta inmunoglobulina Y y existen dos tipos ampliamente utilizados, ELISA de bloqueo y ELISA indirecto (o sándwich). Las principales diferencias entre ambos es que la ELISA de bloqueo se obtiene un resultado negativo cuando se produce cambio de color y tiene la ventaja de que no es especie específico, en cambio en la ELISA indirecto cambia de color cuando la prueba es positiva (unión antígeno anticuerpo) y es especie específico (Spackman y Killian 2020).

En este trabajo se utilizará la técnica de qPCR con el fin de detectar la presencia del virus en tejidos de cadáveres. Esto debido a que es una técnica que tiene buena sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de agentes etiológicos, además que reduce el riesgo de contaminación del genoma y toma menos tiempo (Fu et al., 2023).

Entregados estos antecedentes de H5N1 en aves, relacionados con la etiología, patogenia, características clínicas, anatomo-patológicas, epidemiología e implicancias en salud pública y producción, nace la necesidad de explorar aspectos lesionales y de prevalencia en individuos migratorios, que comparten rutas y hábitat, ya que son verdaderos centinelas del estatus sanitario de otras especies, incluidos los humanos.

Bajo el contexto de One Health, el conocer en profundidad ciertos aspectos de la enfermedad, puede permitir tomar acciones preventivas o correctivas, que van a salvaguardar la salud pública, medioambiental y animal.

2. HIPÓTESIS

Los hallazgos en órganos de aves marinas ingresados a la Unidad de Morfología y Diagnóstico de la Universidad San Sebastián, Sede de la Patagonia, entre los años 2015 y 2025, analizados mediante histopatología y qPCR son concordantes con la presencia del virus de influenza aviar (H5N1).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

- I. Caracterizar histopatológicamente y detectar mediante qPCR el virus de influenza aviar (H5N1), en órganos de aves marinas, ingresados a la Unidad de Morfología y Diagnóstico, entre los años 2015 a 2025.

3.2. Objetivos específicos

- I. Identificar hallazgos histopatológicos de virus de influenza aviar (H5N1), en órganos de aves marinas, ingresados a la Unidad de Morfología y Diagnóstico, entre los años 2015 a 2025.
- II. Describir hallazgos histopatológicos de virus de influenza aviar (H5N1), en órganos de aves marinas, ingresados a la unidad de Morfología y Diagnóstico, entre los años 2015 a 2025.
- III. Detectar mediante qPCR el virus de influenza aviar (H5N1), en órganos de aves marinas, ingresados a la Unidad de Morfología y Diagnóstico, entre los años 2015 a 2025.
- IV. Asociar la presencia o ausencia de lesiones sugerentes de influenza aviar (H5N1) identificadas histopatológicamente, con la positividad o negatividad a la técnica qPCR, en órganos de aves marinas, ingresados a la Unidad de Morfología y Diagnóstico, entre los años 2015 a 2025.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Tipo de estudio

Este estudio fue de carácter no experimental (observacional) y descriptivo, dado que se realizó una observación y descripción de muestras de tejidos con lesiones de cadáveres de aves marinas ingresados a la Unidad de Morfología y Diagnóstico (UMD) de la Universidad San Sebastián, Sede de la Patagonia (sin intervención de los pacientes) y la eventual presencia del virus de la influenza aviar (H5N1). Además, fue de tipo transversal, cuantitativo porque estas muestras fueron de un periodo determinado y se definió la frecuencia del agente H5N1 (Hernández-Sampieri y Mendoza, 2018).

4.2. Especies presentes en el estudio

Se utilizaron muestras de órganos de cadáveres de aves marinas, algunas especies más representativas fueron; pingüinos, gaviotas y cormoranes, que fueron entregados directamente a la UMD por SAG, SERNAPESCA o que procedieron desde Centros de Rehabilitación de Fauna Silvestre (CEREFAS) como la ONG Chiloé Silvestre y CEREFAS de la Universidad San Sebastián (USS). El n que se utilizó en este estudio fue la totalidad de las muestras disponibles en la UMD, el cual se estimó que correspondían a 40 casos de diferentes órdenes de aves marinas. En base a los registros de la UMD, había muestras que estaban en diversas presentaciones, incluyendo tejidos fijados en formalina al 10%, muestras frescas que se obtuvieron mediante necropsias y cortes histológicos que estaban listos para el análisis microscópico, pero en este estudio solo se ocuparon muestras fijadas en formalina al 10%.

4.3. Criterios de inclusión y de exclusión

Se incluyeron a las aves marinas que llegaron a la UMD dentro de los años establecidos (2015 a 2025), que pertenecieron a los órdenes de Charadriiformes, Procellariiformes, Sphenisciformes, Phaethontiformes, Suliformes y Pelecaniformes. Además, se incluyeron

únicamente los casos que contaban con muestras de hígado, riñón, pulmón, corazón e intestino.

Se excluyeron las muestras de tejido y/o cadáveres que estaban fuera del rango de tiempo establecido (2015 a 2025), que no presentaron los órganos requeridos para el estudio y que hayan tenido un deterioro debido al tiempo de fijación o insuficiente fijación, que se evaluaron según lo descrito por Strafuss (1988) o traumas muy importantes que impidieron la correcta toma de muestra y análisis de los tejidos.

4.4. Necropsias y toma de muestras

El cadáver luego de ser admitido en la UMD fue congelado a -18°C en la cámara de congelación del laboratorio de necropsia, para luego ser descongelado y así proceder a la necropsia, para realizar esto, se utilizaron los siguientes materiales:

Equipo de protección personal, tales como overol, pechera plástica, botas, cubre calzado, mascarilla, cofia, guantes, anteojos o antiparras. Estos se deben ocupar sólo en el laboratorio (no ocuparlo fuera del lugar de trabajo) y es de uso personal (Correa et al., 2019).

Elementos para la disección del cadáver y obtención de muestras como pesa gramera, hoja de bisturí, porta bisturí, tijeras, pinzas, cuchillos, chaira, lista de verificación de necropsia (anexo 1), solicitud de necropsia (anexo 2), celular o cámara fotográfica, tabla para cortar de plástico, mesón de acero inoxidable, tubos para recolectar muestras de sangre y fluidos, hisopo, bolsas de plástico con cierre hermético para toma de muestra, bolsa de eliminación de los restos biológicos, caja de desechos cortopunzantes, frasco hermético con formalina tamponada al 10%, jeringas y amarras plásticas (Rae, 2006).

La técnica de necropsia descrita para aves consistió en primera instancia en hacer un examen externo completo del cadáver, se inició por la zona de la cabeza y se finalizó en las extremidades inferiores, para ver si hay anormalidades y/o lesiones en los ojos, cavidad oral, cloaca, plumaje y piel (Majó y Dolz, 2010). A continuación, se procedió a la apertura del cadáver, primero se posicionó en decúbito dorsal y se realizó una incisión longitudinal con un bisturí, tijera o chuchillo desde la base del pico hasta la cloaca, para luego ir desprendiendo la piel (desolle) y así poder acceder a la cavidad celómica,

realizando un corte caudal al borde del esternón por ambos lados y cortar las costillas, retirar los músculos pectorales y la quilla. Finalmente, se observaron los órganos, se realizaron dos ligaduras en la zona del recto y se llevó a cabo la extracción y toma de muestras de los tejidos (Rae, 2006). En este estudio se tomaron muestras de hígado, riñón, pulmón, corazón e intestino.

4.5. Procesamiento de muestras de tejidos

Los materiales necesarios para esto fueron, muestras de necropsia almacenadas en formol tamponado con carbonato de calcio, tabla para cortar de plástico, celular o cámara fotográfica, *cassettes* histológicos de plástico, tubos *eppendorf*, formol tamponado al 10%, alcohol etílico al 70°, 95° y 100°, xilol, procesador de tejidos STP 120 de Myr, parafina líquida a temperatura entre 58 a 65 °C, dispensador de parafina AISET YLD2000, molde de metal, micrótomo Leica RM2125 RTS, cuchillo para histología, agua tibia a 40 °C, baño de flotación Kedee KD-P water bath (recipiente eléctrico), estufa Binder y porta objetos (Muena y Vera, 2021).

Las muestras de tejidos en formol tamponado debieron permanecer a temperatura ambiente durante un mínimo de 24 horas para asegurar una adecuada fijación, la cual se realizó con el objetivo de detener el proceso de autólisis y putrefacción, ya que pueden ocurrir cambios estructurales y morfológicos que pueden alterar el adecuado análisis y diagnóstico. Luego se realizó la microscopía y dictado. En este proceso las muestras fueron visualizadas y seleccionadas macroscópicamente, luego se seccionaron los tejidos en 4 cortes que fueron ubicados en cada cuadrante del *cassette*. De cada cuadrante se extrajo una pequeña muestra que fueron almacenados en un tubo *eppendorf* con formalina tamponada al 10%, para así obtener un *pool* representativo de cada órgano por caso y poder realizar el qPCR, también se hizo una descripción, medición y registro fotográfico de estas. Luego siguió la inclusión de la muestra, que necesita una serie de pasos secuenciales que consistieron en deshidratación, aclaramiento, impregnación (infiltración) y formación del taco (molde). Posteriormente se realizó la microtomía donde se hicieron cortes seriados y finos del taco, una vez obtenidos los cortes en el portaobjeto y retirado de la estufa, se finalizó con la desparafinación (Isaac et al., 2023; Muena y Vera, 2021). Todo el detalle de lo mencionado se encuentra en el anexo 3.

4.6. Procedimiento de tinción

En este estudio se realizó una tinción de rutina HE. Para llevar a cabo la tinción se necesitó la lámina en blanco (corte tisular en portaobjeto), hematoxilina y eosina Winkler, xilol, alcohol al 50%, 70%, 95% y 100%, alumbre de potasio y de amonio, agua destilada y corriente, óxido rojo de mercurio, pinzas, papel absorbente, cubre objetos y resina sintética (Poveda, 2023). El propósito de esto es teñir el núcleo (azulado) y el citoplasma (rosáceo), realizar un análisis y distinguir cambios morfológicos (Muena y Vera, 2021). El procedimiento detallado se encuentra en el anexo 4.

4.7. Análisis Histopatológico

Una vez teñida y montada la muestra se inició con el proceso de análisis y observación de esta, para esto se necesitó un microscopio óptico Leica DM500 con cámara integrada microimaging y aceite de inmersión.

Para analizar las muestras de cada órgano mediante microscopía, se inició con un barrido a aumento menor (4X) en la totalidad de la muestra, para luego elegir diez campos microscópicos aleatorios a aumentos medio-mayor (10X y 40X) (Gartner y Hiatt, 2011).

4.7.1. Histoscore

Los hallazgos observados al microscopio fueron registrados en planillas para luego realizar un histoscore de inflamación, trastornos circulatorios, necróticos, degenerativos y del crecimiento celular (anexo 5). Esta herramienta permitió objetivar y categorizar las lesiones de las muestras que fueron observadas en el microscopio, asignándole un puntaje según la gravedad de la lesión (Universidad Nacional del Litoral, 2012).

4.8. Detección del agente a través de qPCR

Este proceso se realizó en el Laboratorio Institucional de Investigación de la USS, Sede de la Patagonia bajo la supervisión del Dr. Pontigo, solo se utilizaron los *pools* de muestras formoladas (debido a que fueron la mayoría de las muestras disponibles en la UMD) que estaban previamente almacenados en tubos *eppendorf* de tejidos que tuvieron lesiones histopatológicas sugerentes de influenza aviar, kit de extracción de ARN E.Z.N.A.® FFPE RNA kit, enzima para sintetizar ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) M-MLV de Promega, partidores de H5N1 SYBR Green, alcohol

al 70% y 100%, termociclador Bio-rad, centrífuga, micropipetas, puntas con filtro, tubos de microcentrífuga, guantes, delantal blanco y campana de flujo laminar.

Se inició con la extracción de ARN del *pool* de muestras formoladas de tejido a utilizar siguiendo las instrucciones del fabricante de E.Z.N.A.® FFPE RNA kit (anexo 6), luego se determinó la concentración de ARN (ng/µL) a través del equipo de espectrofotometría de microvolumen NanoDrop cuya longitud de onda fue de 260/280 λ , donde los valores de pureza ideales son entre 1.5 a 1.8 Finalmente, se agregó 1-2 μ L de ARN a una concentración final de 50 ng por cada reacción.

Posteriormente se realizó la síntesis de ADNc con las indicaciones del protocolo de la enzima M-MLV de Promega (anexo 7).

Con el ADNc obtenido se efectuó el qPCR con el protocolo del reactivo Briliant® II SYBR® Green qPCR Master Mix de Stratagene (anexo 8) y los partidores diseñados para la detección de hemaglutinina H5 del virus influenza aviar del subtipo H5N1 en aves marinas, los cuales son, forward H5LH1:5'-ACGTATGACTATCCACAATACTCAG-3' y reverse H5RH1:5'-AGACCAGCTACCATGATTGC-3' (Pérez et al., 2012).

Las muestras se procesaron según el protocolo mencionado por Pérez et al. (2012), el cual consistió en incorporar la muestra en el termociclador por 10 minutos a 95 °C, seguido de 40 ciclos a 95 °C por 10 segundos, 55 °C por 10 segundos y 72 °C por 20 segundos, luego de los ciclos se genera una curva de desnaturalización de ADN, 0 segundos a 95 °C, luego 15 segundos a 65 °C, con un aumento de temperatura de 20 °C por segundo y 0 segundos a 95 °C con un incremento de 0,1 °C por segundo, para diferenciar entre la amplificación específica y las no específicas.

Para concluir, se analizaron los resultados de la cifra de ADN de H5N1 amplificado a través de qPCR y definir si la muestra es positiva o negativa a la presencia del agente viral. La positividad de la muestra se determinó a través de diluciones seriadas de la muestra control, la cual debió dar un valor Ct donde se calculó por regresión lineal el rango de positividad.

En el caso de haber detectado un caso positivo de H5N1, se debió haber denunciado al SAG, porque es una EDO (anexo 12).

4.9. Modelo estadístico

En primera instancia se realizó tablas y gráficos de las muestras y resultados obtenidos, esto se llevó a cabo con el programa Microsoft Excel®.

Luego, se ordenaron los datos y se hizo prueba de Fisher, el cual se desarrolló en el programa Prism-GraphPad 10, para comparar los resultados y ver si realmente hay una asociación entre las lesiones sugerentes con la presencia del virus H5N1 (Martínez et al., 2014).

También se ocupó la siguiente fórmula para hacer un cálculo de frecuencia porcentual (Bonita et al., 2008):

$$\% \text{ De lesiones} = \left(\frac{\text{Cantidad de muestras con lesión}}{\text{Total de muestras}} \right) \times 100$$

5. RESULTADOS

5.1. Objetivo I: Identificar hallazgos histopatológicos de virus de influenza aviar (H5N1), en órganos de aves marinas, ingresados a la Unidad de Morfología y Diagnóstico, entre los años 2015 a 2025

Se observaron 200 órganos correspondientes a 40 casos en total, dentro de esto se seleccionaron los órganos con trastornos sugerentes de IAAP, tales como inflamación, necrosis y circulatorio (congestión y hemorragia). Cabe destacar que un órgano puede presentar más de un trastorno.

Tabla 1. Cantidad de órganos por trastornos sugerentes de IAAP.

Trastornos	Órganos									
	Pulmón	% lesiones	Corazón	% lesiones	Riñón	% lesiones	Hígado	% lesiones	Intestino	% lesiones
Inflamación	16	40%	4	10%	2	5%	12	30%	14	35%
Necrosis	2	5%	2	5%	4	10%	5	13%	2	5%
Circulatorio	32	80%	8	20%	19	48%	18	45%	12	30%

Fuente: Elaboración propia, 2025

Sobre el trastorno inflamatorio el órgano que más se vio afectado fue el pulmón con 16 casos (40%), en el caso de la necrosis fue el hígado con 5 casos (13%) y por último en los trastornos circulatorios fue el pulmón con 32 casos (80%). Esto se puede ver detallado en la tabla 1.

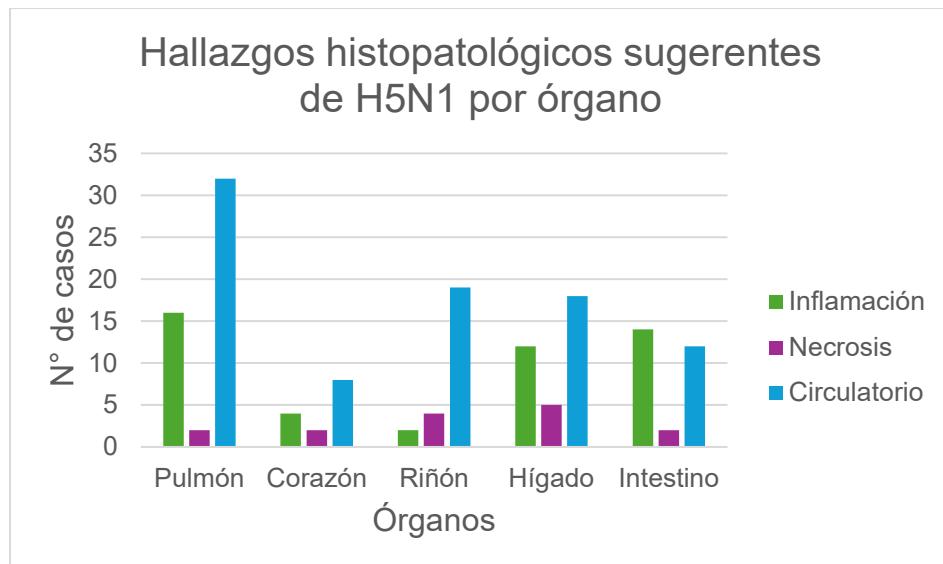


Figura 3. Gráfico de cantidad de casos con trastornos por órgano. Fuente: Elaboración propia, 2025.

El *p* valor fue de 0.0255, por lo que hay una asociación estadísticamente significativa entre los órganos afectados y los trastornos con mayor frecuencia, correspondientes a inflamación y circulatorio (anexo 13).

Tabla 2. Cantidad de tipos de infiltrados inflamatorios por órganos.

Tipo de infiltrado inflamatorio	Órganos										Total	% lesiones
	Pulmón	% lesiones	Corazón	% lesiones	Riñón	% lesiones	Hígado	% lesiones	Intestino	% lesiones		
Células multinucleadas	0	0%	0	0%	0	0%	1	3%	0	0%	1	3%
Granulocitos	0	0%	0	0%	1	3%	0	0%	0	0%	1	3%
Granulocitos eosinófilos	0	0%	0	0%	0	0%	1	3%	1	3%	2	5%
Granuloma caseoso (crónico)	1	3%	0	0%	0	0%	1	3%	0	0%	2	5%
Heterófilos	2	5%	1	3%	0	0%	1	3%	0	0%	4	10%
Linfocitario	8	20%	2	5%	1	3%	8	20%	9	23%	28	70%
Linfoplasmocitario	0	0%	0	0%	0	0%	1	3%	1	3%	2	5%
Mixto	5	13%	0	0%	0	0%	0	0%	3	8%	8	20%
Total	16	40%	3	8%	2	5%	13	33%	14	35%	48	

Fuente: Elaboración propia, 2025.

En la tabla se observa que el pulmón fue el órgano más comprometido con 16 casos (40%) y el infiltrado inflamatorio linfocitario fue el más frecuente, con 28 órganos en total (70%).

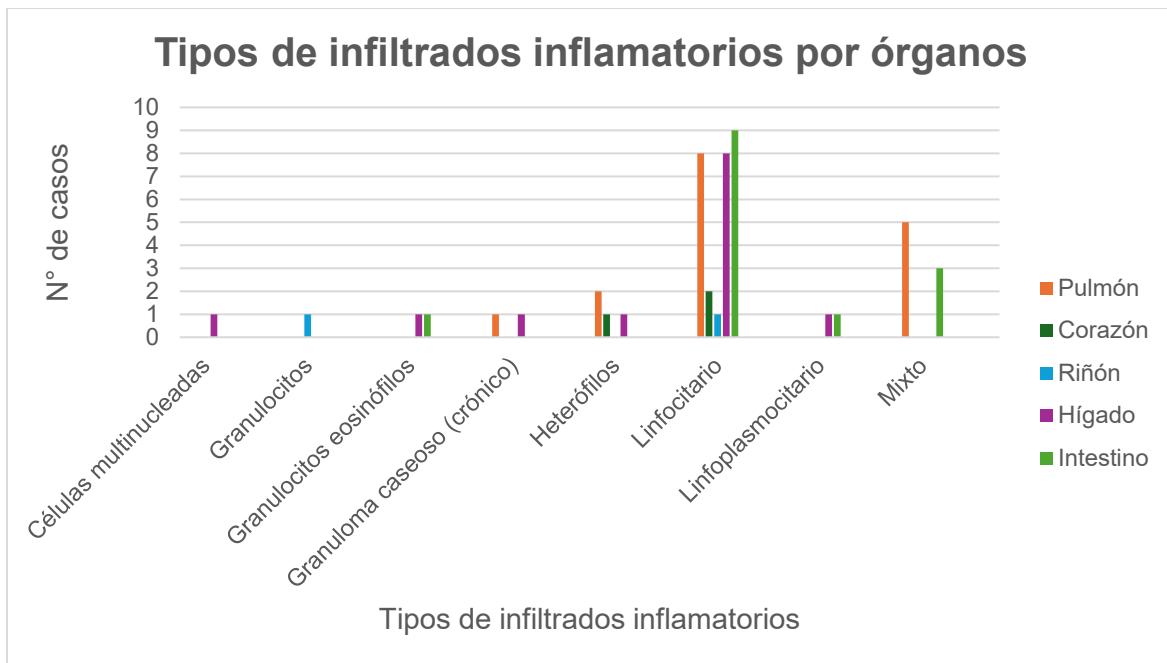


Figura 4. Distribución de órganos por tipo de infiltrado inflamatorio. Fuente: Elaboración propia, 2025.

El valor de p fue 0.2910, lo que significa que no hay una asociación estadísticamente significativa entre los órganos afectados y el infiltrado inflamatorio linfocitario y mixto, que fueron los más recurrentes (anexo 14).

5.2. Objetivo 2: Describir hallazgos histopatológicos de virus de influenza aviar (H5N1), en órganos de aves marinas, ingresados a la unidad de Morfología y Diagnóstico, entre los años 2015 a 2025

5.2.1. Trastorno inflamatorio

En la evaluación del trastorno inflamatorio por especie y por órganos afectados, se logró establecer que el pingüino (*Spheniscus sp.*) fue la especie más afectada en pulmón con 10 casos (25%) y seguido por la gaviota dominicana (*Larus dominicanus*) en intestino con 6 casos (15%), dando un valor de p de 0.0981, lo que significa que no hay una asociación estadísticamente significativa entre las especies y los órganos afectados (anexo 15).

Tabla 3. Frecuencias porcentuales y absolutas de casos con lesión inflamatoria, graduadas mediante histoscore, por órgano y especie afectada, en un total de 40 individuos.

Especies	PULMÓN						Inflamación CORAZÓN						RÍÓN											
	Ausente (0/3)	Focal (1/3)	% lesiones	Multifocal (2/3)	% lesiones	Difuso (3/3)	% lesiones	Ausente (0/3)	Focal (1/3)	% lesiones	Multifocal (2/3)	% lesiones	Difuso (3/3)	% lesiones	Ausente (0/3)	Focal (1/3)	% lesiones	Multifocal (2/3)	% lesiones	Difuso (3/3)	% lesiones	Ausente (0/3)	Focal (1/3)	% lesiones
<i>Ardeola grisea</i>	0	0	0%	0	0%	1	3%	1	0	0%	0	0%	0	0%	1	0	0%	0	0%	0	0%	0	0	0%
<i>Chroicocephalus maculipennis</i>	1	0	0%	0	0%	1	3%	2	0	0%	0	0%	0	0%	2	0	0%	0	0%	0	0%	0	0	0%
<i>Larus dominicanus</i>	7	0	0%	0	0%	1	3%	7	0	0%	1	3%	0	0%	7	0	0%	0	0%	0	0%	1	3%	0%
<i>Leucocarbo atriceps</i>	3	1	3%	0	0%	1	3%	5	0	0%	0	0%	0	0%	5	0	0%	0	0%	0	0%	0	0	0%
<i>Nycticorax nycticorax</i>	0	1	3%	0	0%	0	0%	1	0	0%	0	0%	0	0%	1	0	0%	0	0%	0	0%	0	0	0%
<i>Pachyptila belcheri</i>	1	0	0%	0	0%	0	0%	1	0	0%	0	0%	0	0%	1	0	0%	0	0%	0	0%	0	0	0%
<i>Pelecanus thagus</i>	4	0	0%	0	0%	0	0%	3	0	0%	1	3%	0	0%	4	0	0%	0	0%	0	0%	0	0	0%
<i>Spheniscus sp.</i>	8	1	3%	3	8%	6	15%	16	1	3%	1	3%	0	0%	17	1	3%	0	0%	0	0%	0	0	0%

Especies	HÍGADO						Inflamación INTESTINO							
	Ausente (0/3)	Focal (1/3)	% lesiones	Multifocal (2/3)	% lesiones	Difuso (3/3)	% lesiones	Ausente (0/3)	Focal (1/3)	% lesiones	Multifocal (2/3)	% lesiones	Difuso (3/3)	% lesiones
<i>Ardeola grisea</i>	0	0	0%	1	3%	0	0%	0	0	0%	0	0%	1	3%
<i>Chroicocephalus maculipennis</i>	1	1	3%	0	0%	0	0%	1	0	0%	0	0%	1	3%
<i>Larus dominicanus</i>	6	1	3%	1	3%	0	0%	4	0	0%	1	3%	3	8%
<i>Leucocarbo atriceps</i>	5	0	0%	0	0%	0	0%	4	0	0%	0	0%	1	3%
<i>Nycticorax nycticorax</i>	1	0	0%	0	0%	0	0%	1	0	0%	0	0%	0	0%
<i>Pachyptila belcheri</i>	1	0	0%	0	0%	0	0%	0	0	0%	0	0%	1	3%
<i>Pelecanus thagus</i>	3	1	3%	0	0%	0	0%	4	0	0%	0	0%	0	0%
<i>Spheniscus sp.</i>	11	0	0%	4	10%	3	8%	12	0	0%	3	8%	3	8%

Fuente: Elaboración propia, 2025.

Histoscore de trastornos inflamatorios por órganos y especies

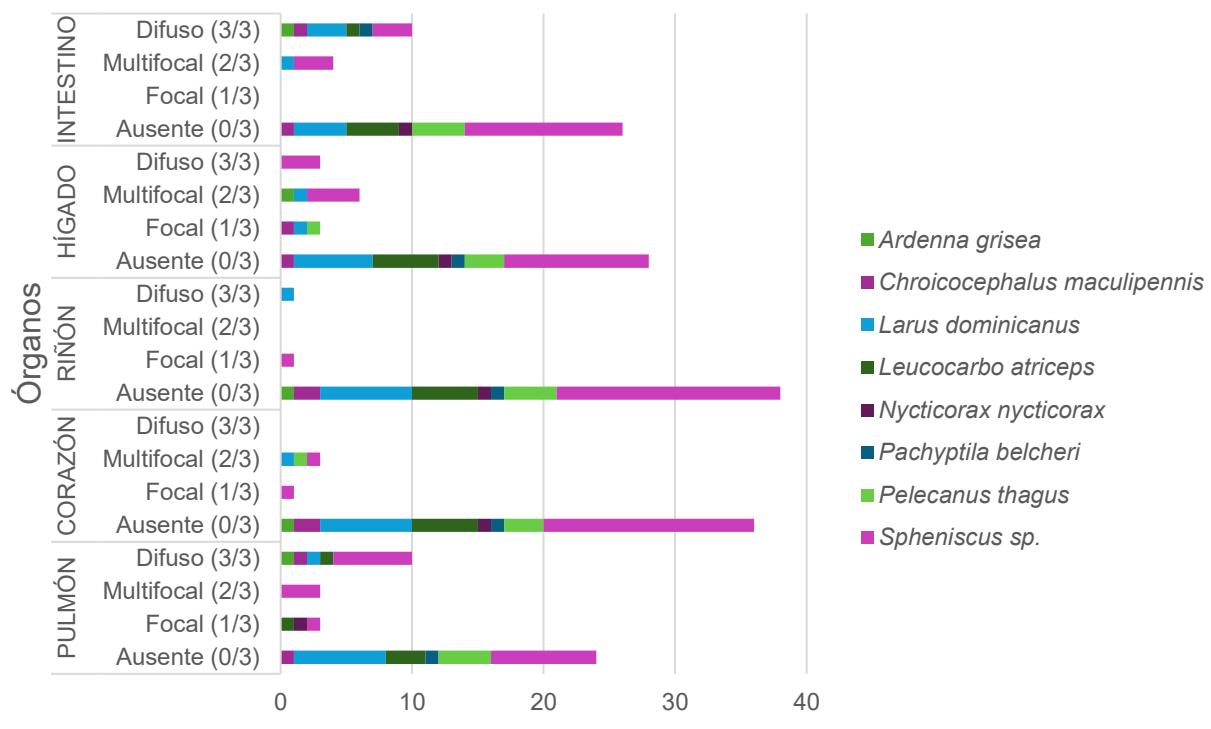


Figura 5. Distribución del histoscore del trastorno inflamatorio por especie y órganos. Fuente: Elaboración propia, 2025.

Tabla 4. Frecuencia absoluta y porcentual de casos con inflamación, según el grado y el órgano.

Órgano	Trastorno inflamatorio						
	Ausente (0/3)	Focal (1/3)	% lesiones	Multifocal (2/3)	% lesiones	Difuso (3/3)	% lesiones
Pulmón	24	3	8%	3	8%	10	25%
Corazón	36	1	3%	3	8%	0	0%
Riñón	38	1	3%	0	0%	1	3%
Hígado	28	3	8%	6	15%	3	8%
Intestino	26	0	0%	4	10%	10	25%

Fuente: Elaboración propia, 2025.

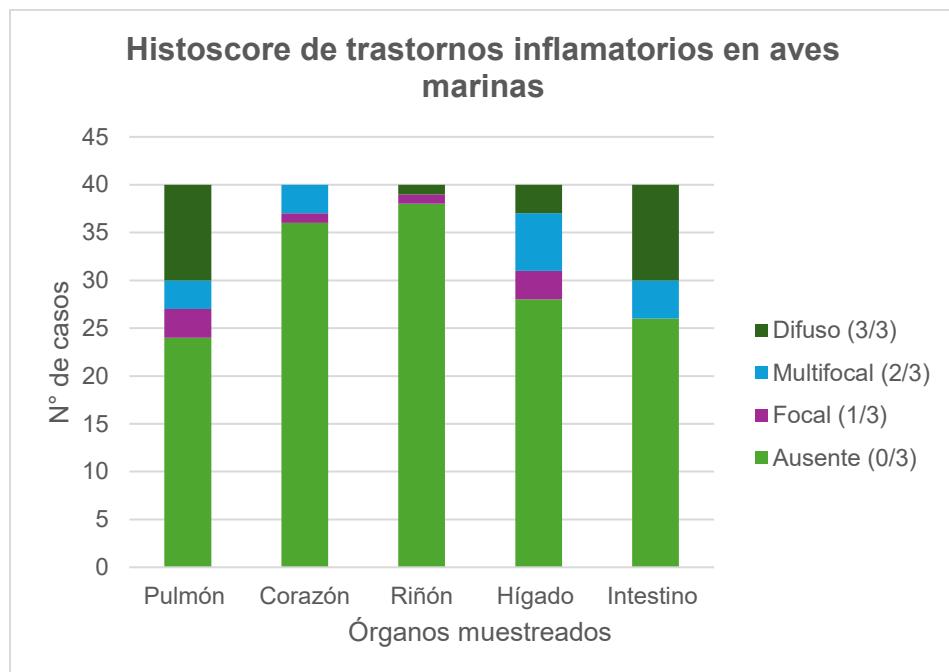


Figura 6. Histoscore de inflamación en aves marinas según cada órgano. Fuente: Elaboración propia, 2025.

El p valor fue de 0.4587, por lo que no hay una asociación estadísticamente significativa entre los órganos más afectados (pulmón e intestino) y el trastorno inflamatorio (anexo 16).

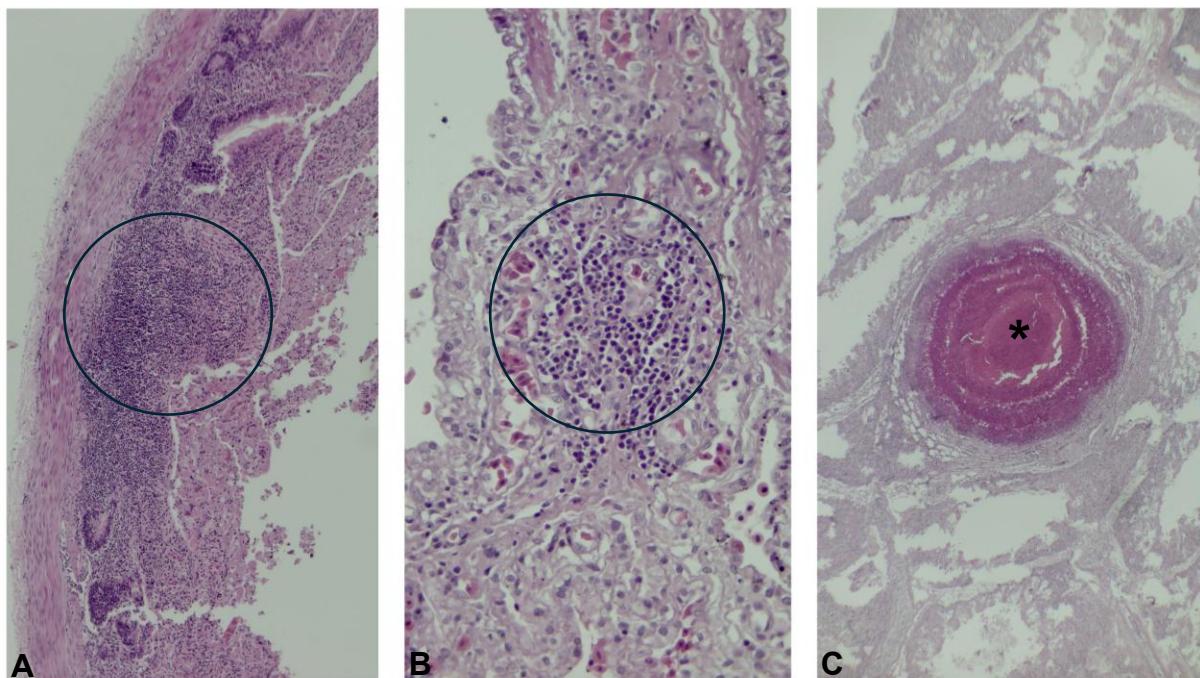


Figura 7. Trastornos inflamatorios en intestino y pulmón de aves marinas. Fuente: Elaboración propia, 2025. **(A).** Intestino de fardela (*Ardenna grisea*) con infiltrado inflamatorio linfocitario difuso (3/3) en mucosa intestinal (círculo). HE. 4X. **(B).** Muestra de pulmón de pingüino (*Spheniscus sp.*), se observa infiltrado inflamatorio linfocitario multifocal (2/3) en la zona peribronquial (círculo). HE. 40X. **(C).** Tejido pulmonar de pingüino (*Spheniscus sp.*) afectado por un granuloma caseoso (asterisco) que se presentó en forma multifocal (2/3), indicando una inflamación crónica del pulmón. HE. 10X.

5.2.2. Trastorno necrótico

Tras el análisis del trastorno necrótico por especie y órganos, se identificó que las especies más afectadas fueron nuevamente el pingüino (*Spheniscus sp.*) presentando 3 casos en riñón (8%) e hígado, seguido por la gaviota dominicana (*Larus dominicanus*) con 1 caso en corazón, riñón, hígado e intestino.

Tabla 5. Cantidad de casos por grado de trastorno necrótico por órgano y especie.

Especies	PULMÓN						CORAZÓN						RIÑÓN											
	Ausente (0/3)	Focal (1/3)	% lesiones	Multifocal (2/3)	% lesiones	Difuso (3/3)	% lesiones	Ausente (0/3)	Focal (1/3)	% lesiones	Multifocal (2/3)	% lesiones	Difuso (3/3)	% lesiones	Ausente (0/3)	Focal (1/3)	% lesiones	Multifocal (2/3)	% lesiones	Difuso (3/3)	% lesiones	Ausente (0/3)	Focal (1/3)	% lesiones
<i>Ardenna grisea</i>	1	0	0%	0	0%	0	0%	1	0	0%	0	0%	0	0%	1	0	0%	0	0%	0	0%	0	0	0%
<i>Chroicocephalus maculipennis</i>	2	0	0%	0	0%	0	0%	1	1	3%	0	0%	0	0%	2	0	0%	0	0%	0	0%	0	0	0%
<i>Larus dominicanus</i>	8	0	0%	0	0%	0	0%	7	1	3%	0	0%	0	0%	7	0	0%	1	3%	0	0%	0	0	0%
<i>Leucocarbo atriceps</i>	5	0	0%	0	0%	0	0%	5	0	0%	0	0%	0	0%	5	0	0%	0	0%	0	0%	0	0	0%
<i>Nycticorax nycticorax</i>	1	0	0%	0	0%	0	0%	1	0	0%	0	0%	0	0%	1	0	0%	0	0%	0	0%	0	0	0%
<i>Pachyptila belcheri</i>	1	0	0%	0	0%	0	0%	1	0	0%	0	0%	0	0%	1	0	0%	0	0%	0	0%	0	0	0%
<i>Pelecanus thagus</i>	4	0	0%	0	0%	0	0%	4	0	0%	0	0%	0	0%	4	0	0%	0	0%	0	0%	0	0	0%
<i>Spheniscus sp.</i>	16	0	0%	1	3%	1	3%	18	0	0%	0	0%	0	0%	15	2	0%	1	3%	0	0%	0	0	0%

Especies	HÍGADO						Necrosis						INTESTINO											
	Ausente (0/3)	Focal (1/3)	% lesiones	Multifocal (2/3)	% lesiones	Difuso (3/3)	% lesiones	Ausente (0/3)	Focal (1/3)	% lesiones	Multifocal (2/3)	% lesiones	Difuso (3/3)	% lesiones	Ausente (0/3)	Focal (1/3)	% lesiones	Multifocal (2/3)	% lesiones	Difuso (3/3)	% lesiones	Ausente (0/3)	Focal (1/3)	% lesiones
<i>Ardenna grisea</i>	1	0	0%	0	0%	0	0%	1	0	0%	0	0%	0	0%	0	0	0%	0	0%	0	0%	0	0	0%
<i>Chroicocephalus maculipennis</i>	2	0	0%	0	0%	0	0%	2	0	0%	0	0%	0	0%	0	0	0%	0	0%	0	0%	0	0	0%
<i>Larus dominicanus</i>	7	0	0%	1	3%	0	0%	7	0	0%	0	0%	0	0%	1	0	0%	0	0%	1	3%	0	0	0%
<i>Leucocarbo atriceps</i>	4	0	0%	1	3%	0	0%	5	0	0%	0	0%	0	0%	5	0	0%	0	0%	0	0%	0	0	0%
<i>Nycticorax nycticorax</i>	1	0	0%	0	0%	0	0%	0	0	0%	0	0%	0	0%	1	0	0%	0	0%	0	0%	0	0	0%
<i>Pachyptila belcheri</i>	1	0	0%	0	0%	0	0%	0	0	0%	0	0%	0	0%	1	0	0%	0	0%	0	0%	0	0	0%
<i>Pelecanus thagus</i>	4	0	0%	0	0%	0	0%	4	0	0%	0	0%	0	0%	4	0	0%	0	0%	0	0%	0	0	0%
<i>Spheniscus sp.</i>	15	1	3%	2	5%	0	0%	17	0	0%	1	25%	0	0%	1	0	0%	0	0%	0	0%	0	0	0%

Fuente: Elaboración propia, 2025.

Histoscore de trastornos necróticos por órganos y especies

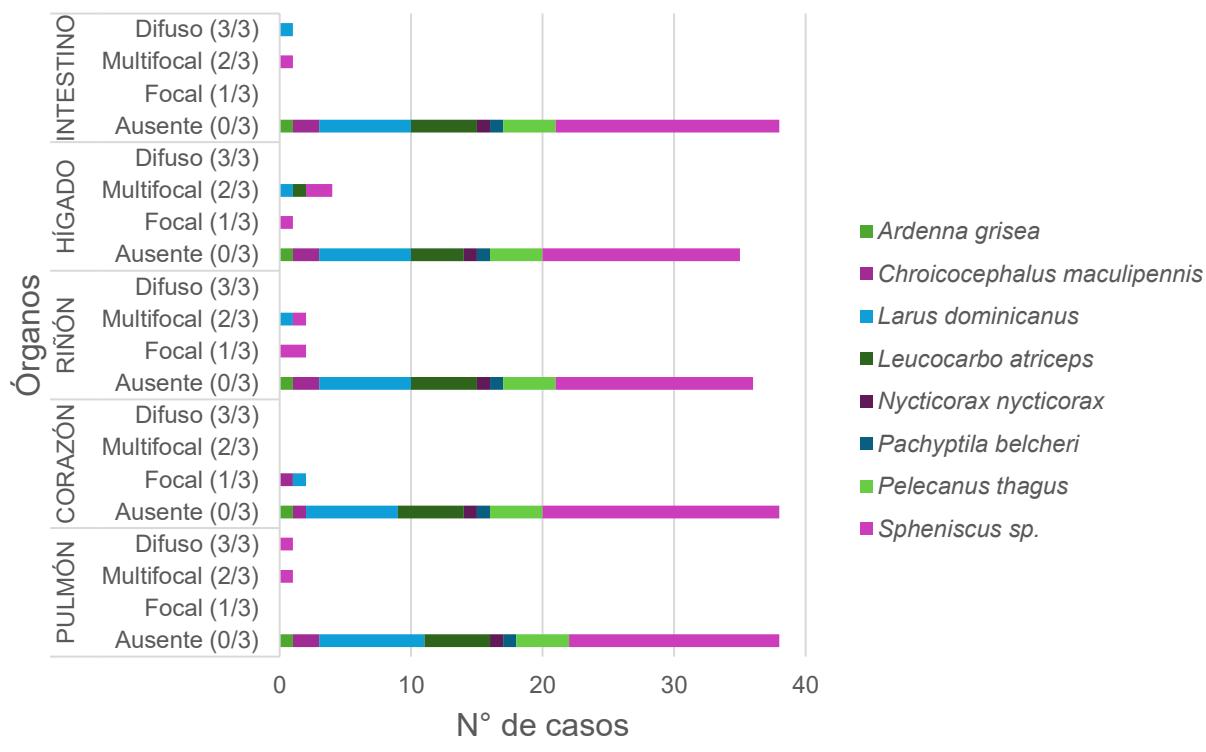


Figura 8. Distribución del histoscore del trastorno necrótico por especie y órganos.

Fuente: Elaboración propia, 2025.

Se obtuvo un valor de p de 0.5916, lo cual significa que no hay una asociación estadísticamente significativa entre los órganos de las especies más afectadas con el trastorno necrótico (anexo 17).

Tabla 6. Frecuencia absoluta y porcentual de casos con necrosis, según el grado y el órgano.

Órgano	Trastorno necrótico						
	Ausente (0/3)	Focal (1/3)	% lesiones	Multifocal (2/3)	% lesiones	Difuso (3/3)	% lesiones
Pulmón	38	0	0%	1	3%	1	3%
Corazón	38	2	5%	0	0%	0	0%
Riñón	36	2	5%	2	5%	0	0%
Hígado	35	2	5%	3	8%	0	0%
Intestino	38	0	0%	1	3%	1	3%

Fuente: Elaboración propia, 2025.

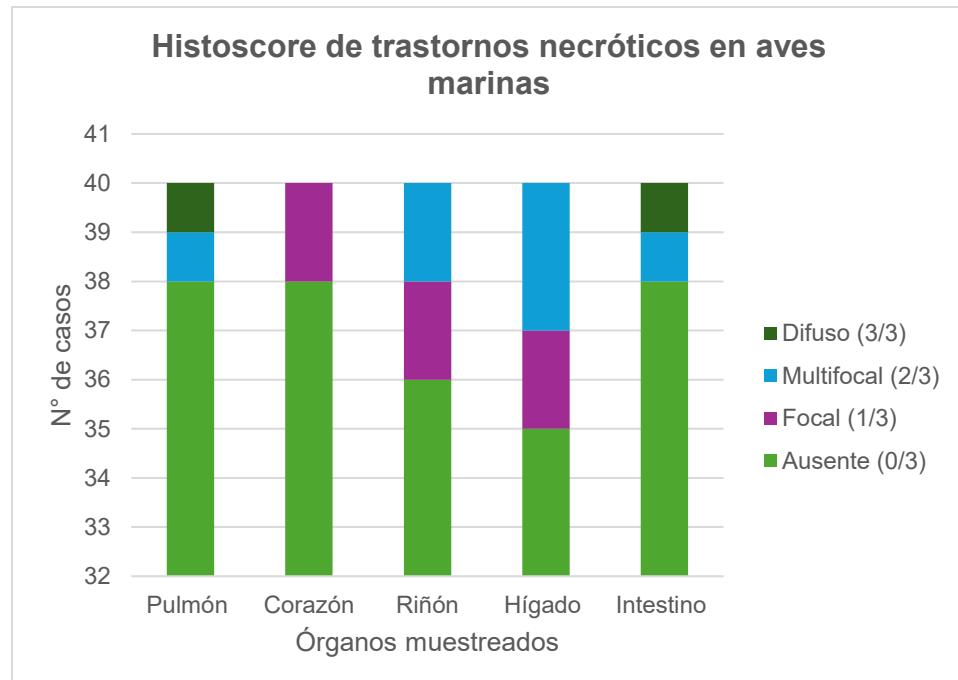


Figura 9. Histoscore de necrosis en aves marinas según cada órgano. Fuente: Elaboración propia, 2025.

El p valor fue de 0.9999, lo que indica que no hay una asociación estadísticamente significativa entre los órganos más afectados (riñón e hígado) y el trastorno necrótico (anexo 18).

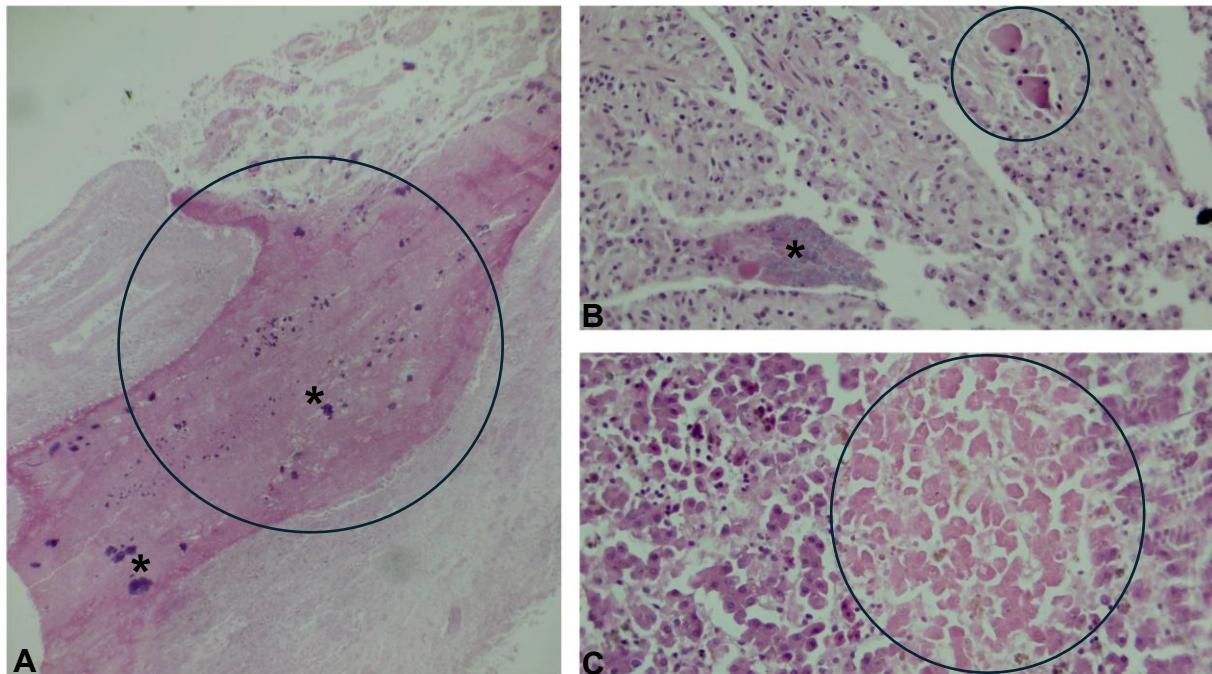


Figura 10. Órganos de aves marinas con lesiones necróticas. Fuente: Elaboración propia, 2025. **(A).** Necrosis (círculo) multifocal (2/3) en corazón de gaviota dominicana (*Larus dominicanus*) con calcificación cardiaca (asterisco). HE. 4X. **(B).** Intestino de pingüino (*Spheniscus sp.*) con necrosis (círculo) multifocal (2/3) y acúmulos bacterianos (asterisco). HE. 40X. **(C).** Foco (1/3) necrótico (círculo) en hígado de pingüino (*Spheniscus sp.*). HE. 40X.

5.2.3. Trastorno circulatorio

Tabla 7. Frecuencia absoluta y porcentual de casos con trastorno circulatorio, según el grado y el órgano.

Órgano	Trastorno circulatorio						
	Ausente (0/3)	Focal (1/3)	% lesiones	Multifocal (2/3)	% lesiones	Difuso (3/3)	% lesiones
Pulmón	8	2	5%	6	15%	31	78%
Corazón	32	1	3%	5	13%	2	5%
Riñón	19	1	3%	8	20%	12	30%
Hígado	22	2	5%	3	8%	13	33%
Intestino	28	1	3%	2	5%	9	23%

Fuente: Elaboración propia, 2025.

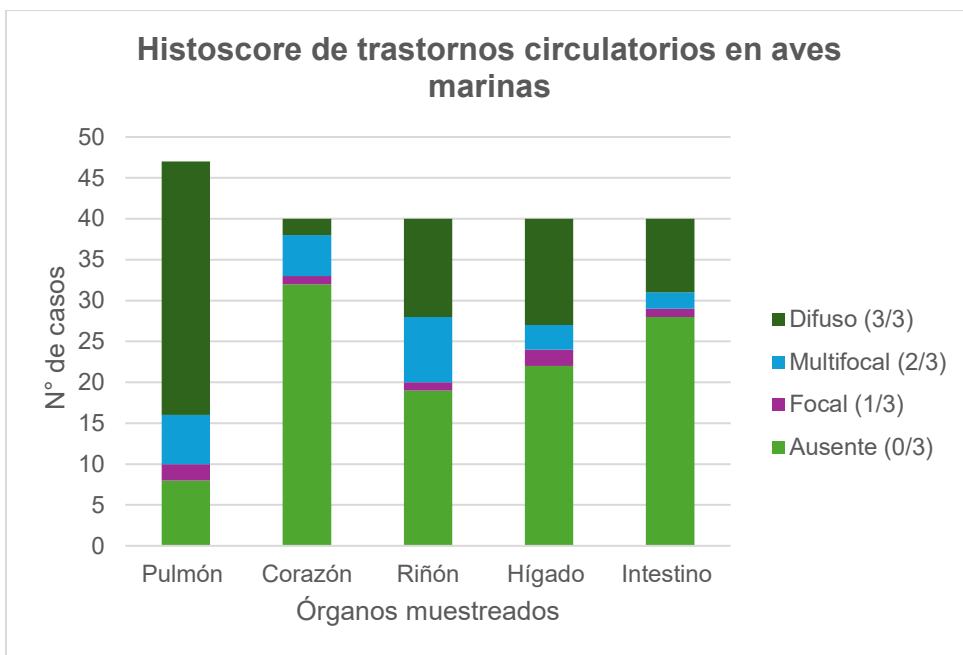


Figura 11. Histoscore de trastornos circulatorios en aves marinas según cada órgano. Fuente: Elaboración propia, 2025.

En cuanto al trastorno circulatorio, se determinó que el pulmón fue el órgano más afectado con lesiones difusas (78%) y en segundo lugar fue el hígado (33%), cabe destacar que una muestra podía tener más de un trastorno circulatorio. El resultado de p valor fue 0.1213, por esta razón no hay una asociación estadísticamente significativa entre los órganos más afectados y el trastorno circulatorio (anexo 19).

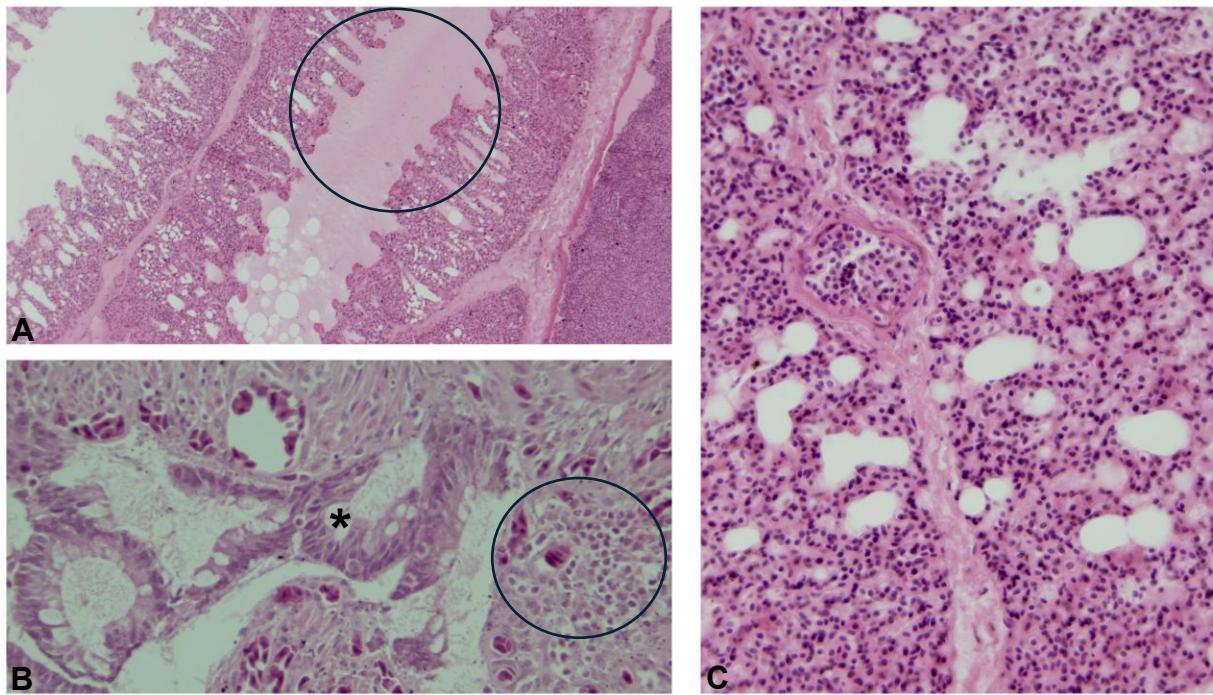


Figura 12. Tejidos de pingüinos (*Spheniscus sp.*) con trastornos circulatorios.

Fuente: Elaboración propia, 2025. **(A).** Pulmón con edema (círculo) difuso (3/3), congestión difusa (3/3) e hiperemia difusa (3/3). HE. 40X. **(B).** Intestino con presencia de hemorragia (círculo) difusa (3/3) y degeneración mucosa (asterisco). HE. 40X. **(C).** Pulmón con congestión difusa (3/3), edema difuso (3/3) e infiltrado inflamatorio linfocitario. HE. 40X.

5.2.4. Trastorno degenerativo

Tabla 8. Frecuencia absoluta y porcentual de casos con trastorno degenerativo, según el grado y el órgano.

Órgano	Trastorno degenerativo						
	Ausente (0/3)	Focal (1/3)	% lesiones	Multifocal (2/3)	% lesiones	Difuso (3/3)	% lesiones
Pulmón	40	0	0%	0	0%	0	0%
Corazón	40	0	0%	0	0%	0	0%
Riñón	34	1	3%	2	5%	3	8%
Hígado	33	0	0%	1	3%	6	15%
Intestino	21	0	0%	2	5%	17	43%

Fuente: Elaboración propia, 2025.

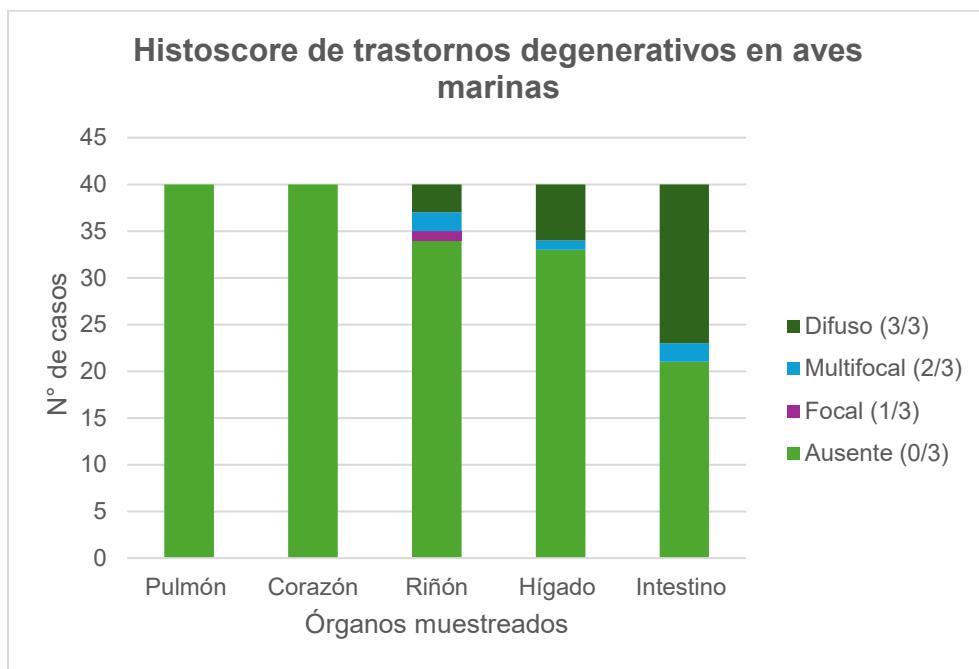


Figura 13. Histoscore de trastornos degenerativos en aves marinas según cada órgano. Fuente: Elaboración propia, 2025.

En el trastorno degenerativo los órganos que más presentaron lesiones fueron el intestino con 19 ejemplares (48%) y el hígado con 7 ejemplares (18%).

El valor obtenido de p fue 0.9999, por este motivo no hay una asociación estadísticamente significativa entre los órganos más afectados y el trastorno degenerativo (anexo 20).

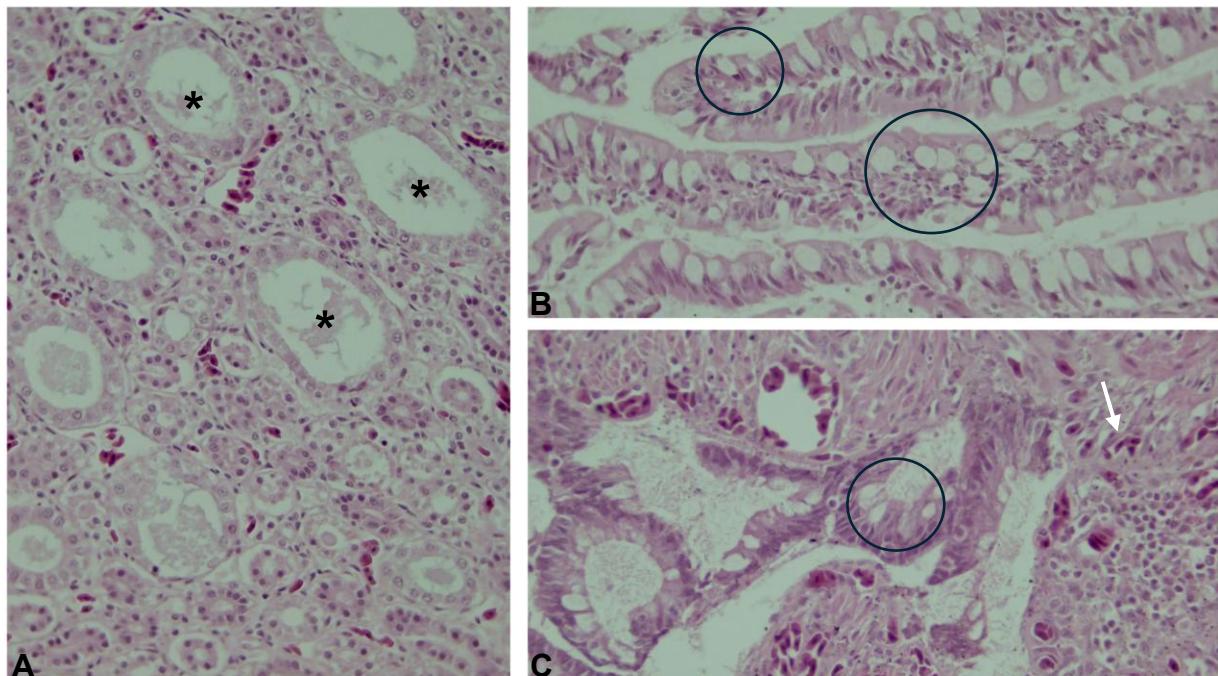


Figura 14. Órganos de pingüinos (*Spheniscus sp.*) con lesiones degenerativas.

Fuente: Elaboración propia, 2025. **(A)**. Muestra de riñón que presenta acúmulos hialinos multifocales (2/3) intratubulares (asteriscos) y congestión. HE. 40X. **(B)**. Degeneración mucosa difusa (3/3) e hiperplasia de vellosidades intestinales (círculos). HE. 10X. **(C)**. Degeneración mucosa (círculo) difusa (3/3) y hemorragia (flecha) en intestino. HE. 40X.

5.2.5. Trastorno del crecimiento

Tabla 9. Cantidad de casos con trastorno del crecimiento según el grado y el órgano.

Órgano	Trastorno del crecimiento						
	Ausente (0/3)	Focal (1/3)	% lesiones	Multifocal (2/3)	% lesiones	Difuso (3/3)	% lesiones
Pulmón	40	0	0%	0	0%	0	0%
Corazón	40	0	0%	0	0%	0	0%
Riñón	40	0	0%	0	0%	0	0%
Hígado	39	1	3%	0	0%	0	0%
Intestino	26	0	0%	1	3%	13	33%

Fuente: Elaboración propia, 2025.

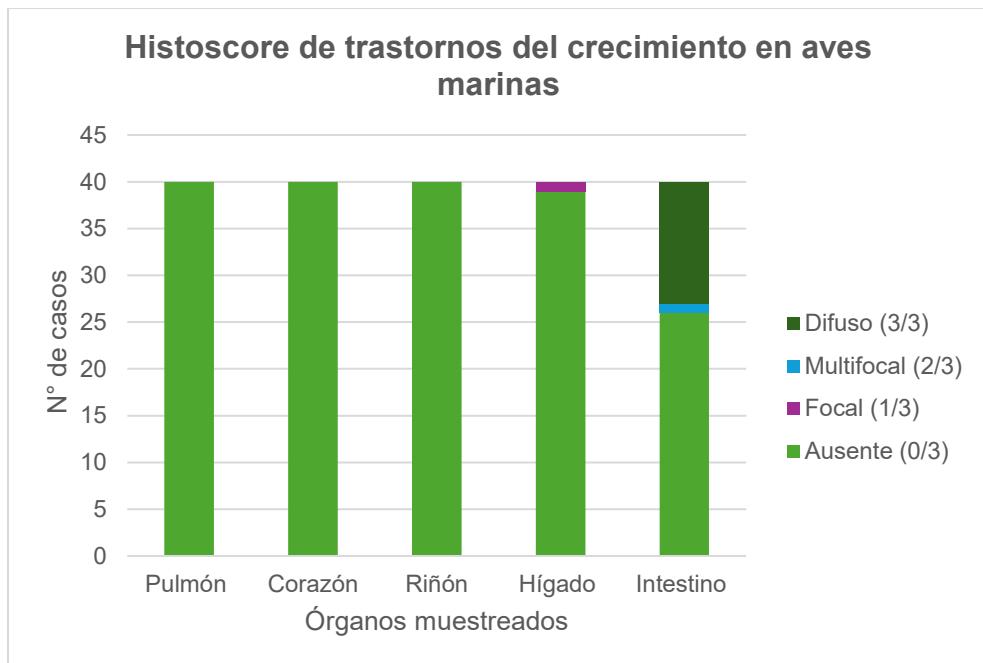


Figura 15. Histoscore de trastornos del crecimiento en aves marinas según cada órgano. Fuente: Elaboración propia, 2025.

Tras la observación de las muestras se determinó que el intestino presentó la mayor proporción de órganos afectados, con 14 casos (35%) y el siguiente órgano fue el hígado registrando 1 caso (3%).

El *p* valor entregado fue 0.1333, esto hace que no haya una asociación estadísticamente significativa entre las muestras con más lesiones y el trastorno del crecimiento (anexo 21).

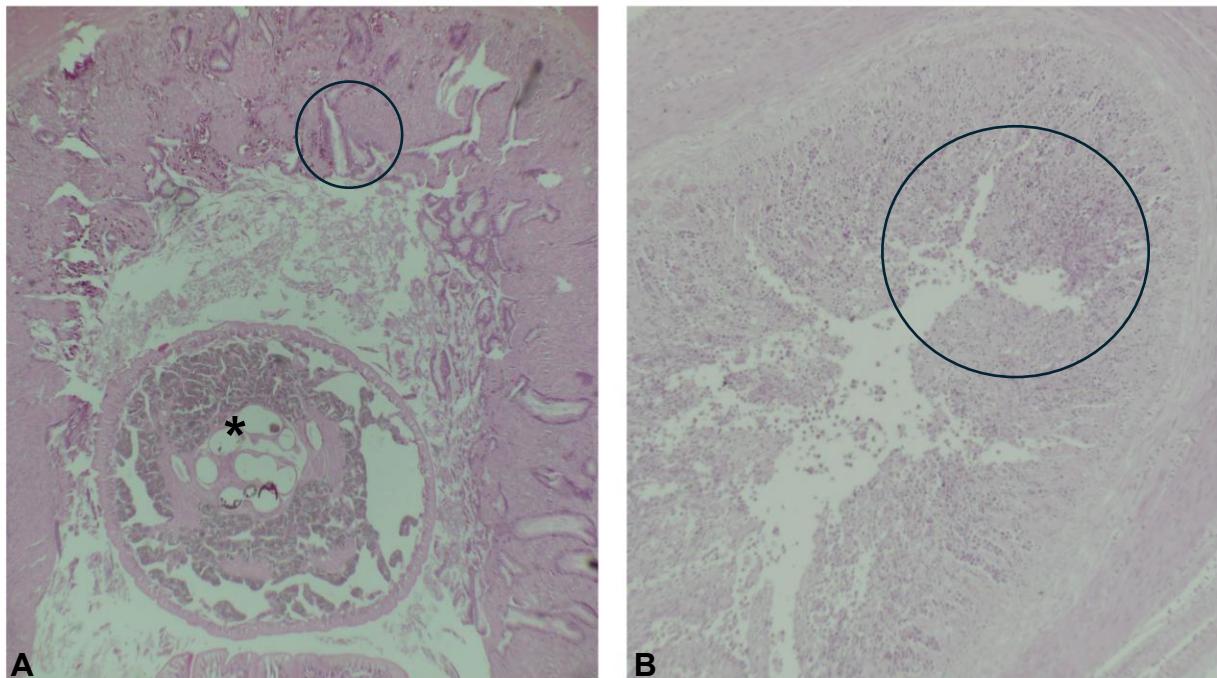


Figura 16. Intestinos de aves marinas con trastornos del crecimiento. Fuente: Elaboración propia, 2025. **(A).** Pingüino (*Spheniscus sp.*) con fusión de vellosidades (círculo) difusa (3/3) y parásito nematodo (asterisco). HE. 4X. **(B).** Hiperplasia (círculo) multifocal (2/3) y fusión de vellosidades en gaviota dominicana (*Larus dominicanus*). HE. 10X.

5.3. Detectar mediante qPCR el virus de influenza aviar (H5N1), en órganos de aves marinas, ingresados a la Unidad de Morfología y Diagnóstico, entre los años 2015 a 2025

Luego de la extracción de ARN de 13 muestras con lesiones sugerentes de IAAP, se procedió a hacer la medición de la pureza (relación A260/A280) y la concentración de este, obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 10. Resultados de la medición de concentración y pureza del ARN extraído.

Parámetros	
Concentración (ng/µL)	Relación A260/A280
3.285	0.95
6.971	0.80
18.804	1.02
5.324	1.08
4.351	0.88
5.838	0.91
7.53	0.88
8.474	0.87
6.288	0.81
12.891	0.87
13.403	1.21
23.032	1.22
20.248	1.14

Fuente: Elaboración propia, 2025.

Esto demuestra que en casi todas las muestras la concentración de ARN era baja y en la mayoría de los casos estaba contaminado con proteínas (según la relación de absorbancia A260/A280). De acuerdo con los resultados, las extracciones de ARN no fueron las ideales para hacer qPCR, pero de todas maneras se decidió realizar el qPCR.

5.4. Asociar la presencia o ausencia de lesiones sugerentes de influenza aviar (H5N1) identificadas histopatológicamente, con la positividad o negatividad a la técnica qPCR, en órganos de aves marinas, ingresados a la Unidad de Morfología y Diagnóstico, entre los años 2015 a 2025

Tabla 11. Casos de diferentes especies y órganos con hallazgos histopatológicos que se sometieron a qPCR y sus respectivos resultados.

ID Caso	Especie	Órgano	Hallazgo	Resultado qPCR
1749-22N	<i>Larus dominicanus</i>	Corazón	Hemorragia epicárdica	Negativo
1480-21N	<i>Larus dominicanus</i>	Riñón	Congestión	Negativo
62-25N	<i>Leucocarbo sp.</i>	Pulmón	Edema e infiltrado inflamatorio mixto	Negativo
1120-18N	<i>Leucocarbo sp.</i>	Hígado	Hiperemia y degeneración grasa	Negativo
1440-21N	<i>Leucocarbo sp.</i>	Intestino	Hemorragia y degeneración mucosa	Negativo
52-25N	<i>Spheniscus sp.</i>	Hígado	Infiltrado linfocitario en espacios porta	Negativo
54-25N	<i>Spheniscus sp.</i>	Pulmón	Hiperemia, congestión y heterófilos	Negativo
880-17N	<i>Spheniscus sp.</i>	Riñón	Congestión	Negativo
880-17N	<i>Spheniscus sp.</i>	Pulmón	Congestión	Negativo
2230-24H	<i>Spheniscus sp.</i>	Pulmón	Congestión y edema	Negativo
1015-18N	<i>Spheniscus sp.</i>	Corazón	Hiperemia y heterófilos	Negativo
1677-22N	<i>Spheniscus sp.</i>	Riñón	Necrosis y congestión	Negativo
1528-21N	<i>Spheniscus sp.</i>	Hígado	Necrosis e infiltrado linfocitario	Negativo

Fuente: Elaboración propia, 2025.

Ninguna muestra tuvo amplificación de ADN, por lo que el resultado de todas fue negativo en el qPCR. Como consecuencia de esto, no se puede asociar la presencia de lesiones sugerentes de IAAP con el resultado del qPCR.

6. DISCUSIÓN

En esta investigación se analizaron histopatológicamente 200 órganos, correspondientes a 40 casos de 8 especies de aves marinas. Los hallazgos del trastorno inflamatorio, necrótico, circulatorio, degenerativo y del crecimiento se graduaron en un histoscore para filtrar de manera más objetiva las muestras con hallazgos sugerentes de IAAP descritos por Landmann et al. (2021).

A partir de este análisis, se identificaron 44 muestras con hallazgos sugerentes a IAAP, de estas muestras se seleccionaron aleatoriamente 13 muestras para realizar el qPCR, pero como no hubo amplificación de ADN, se decidió no proseguir con la técnica molecular para las muestras restantes.

6.1. Objetivo I: Identificar hallazgos histopatológicos de virus de influenza aviar (H5N1), en órganos de aves marinas, ingresados a la Unidad de Morfología y Diagnóstico, entre los años 2015 a 2025

Dentro de las 200 muestras que se observaron, la gran mayoría presentó hallazgos del trastorno necrótico, inflamatorio y circulatorio (principalmente congestión y hemorragia) o una combinación de estas, lo cual concuerda con los trastornos histopatológicos más frecuentes en H5N1 descritos por Lean et al. (2023).

El órgano más afectado fue el pulmón con trastornos circulatorios (tabla 1), coincidiendo con lo mencionado por Abou-Rawash et al. (2012). Sin embargo, Landman et al. (2021), mencionan que el pulmón con trastorno necrótico es el hallazgo más frecuente en aves infectadas con H5N1.

Cabe mencionar que la prueba de Fisher arrojó un *p* valor de 0.0255, lo que indica que sí hay una relación entre los órganos afectados y los trastornos sugerentes de IAAP.

En cuanto a los tipos de infiltrados inflamatorios, en este estudio el más común fue el infiltrado inflamatorio linfocitario, este se presentó con mayor recurrencia en hígado,

pulmón e intestino (tabla 2), este hallazgo es similar a lo mencionado por Rhyoo et al. (2015), quienes en su estudio el infiltrado inflamatorio con mayor presentación también fue el linfocitario, pero el único órgano predominante fue el hígado. Por otra parte, Mosad et al. (2020), indican que el infiltrado inflamatorio linfocitario fue el más común, junto con el infiltrado inflamatorio heterofílico, afectando órganos como el hígado, pulmón, tráquea, páncreas y bazo. En este estudio también destacaron que el hígado fue particularmente importante, ya que tenía áreas necróticas junto con infiltrado inflamatorio linfocitario, lo que lo hace un hallazgo característico para este virus.

6.2. Objetivo 2: Describir hallazgos histopatológicos de virus de influenza aviar (H5N1), en órganos de aves marinas, ingresados a la unidad de Morfología y Diagnóstico, entre los años 2015 a 2025

Según Adlhoch et al. (2022), los trastornos inflamatorios y necróticos son los hallazgos histopatológicos más prominentes en aves con IAAP. En este estudio las especies que más presentaron estas lesiones fueron el pingüino (*Spheniscus sp.*) y la gaviota dominicana (*Larus dominicanus*), observándose una mayor prevalencia en las lesiones necróticas por sobre las inflamatorias. Network of expertise on animal influenza, (OFFLU, 2023) reportó las muertes de aves marinas entre los años 2022 y 2023 coincidiendo con el brote más reciente de IAAP. En el caso de Chile, las especies más afectadas fueron la gaviota dominicana (*Larus dominicanus*), el pelícano de humboldt (*Thagus pelecanus*) y el cormorán guanay (*Leucocarbo bougainvillii*), todas incluidas en la presente investigación. Es probable que estas especies sean más susceptibles al virus, porque se conocen como aves guaneras, es decir, especies que viven en grandes colonias y anidan en islotes rocosos, donde se acumula guano y además cohabitan con diversas especies, lo que aumenta la probabilidad de contraer la IAAP (Leguia et al., 2023).

Es importante destacar que el trastorno necrótico no es específico del virus H5N1, este también es un hallazgo frecuente en otras cepas del virus como H5N6. Según lo documentado por Bae et al. (2018), se observaron lesiones necróticas, congestivas y hemorrágicas en la gran mayoría de los órganos viscerales de aves infectadas con H5N6.

Sobre los trastornos circulatorios se estableció que el pulmón y el hígado fueron los órganos más afectados por este trastorno, pudiendo presentar principalmente hallazgos

como edema, hemorragia y/o congestión. Esto concuerda con Hsueh et al. (2024) y Perkins y Swayne (2001), los autores describen que la congestión y edema pulmonar estuvieron presentes en la gran mayoría de sus muestras. En cambio, en ambas investigaciones mencionaron que la lesión que predominó en el hígado fue la necrosis.

Los órganos que más presentaron lesiones del trastorno degenerativo fueron el intestino y el hígado. Padilla et al. (2004) observaron en el intestino delgado degeneración vacuolar en lámina propia y en el hígado degeneración del parénquima. Por el contrario, Teifke et al. (2007) mencionan que el intestino no presentó ninguna lesión y en hígado hubo hallazgos de necrosis y trastornos circulatorios. A pesar de estas discrepancias, ambos estudios concuerdan que el encéfalo presenta lesiones del trastorno degenerativo, pero en el presente estudio no se analizaron muestras de encéfalo.

En este estudio, el órgano que presentó mayor cantidad de casos con trastornos del crecimiento fue el intestino, destacando la hiperplasia de vellosidades intestinales. Este hallazgo no es común en literatura de IAAP, por lo que podría ser sugerente de otra patología. Lo que se observa frecuentemente en intestino de aves con IAAP es enteritis con infiltrado linfocitario (Ramis et al., 2014), hemorragia y necrosis (Suba, 2014).

Varios autores mencionan que el virus se replica principalmente en el sistema nervioso central, vías respiratorias e intestino (Adzic et al., 2024; Lean et al., 2023; Ramis et al., 2014), pero la replicación viral en intestino es algo general de los virus influenza (Webster et al., 1977), lo que significa que la vía de transmisión fecal-oral es común en esta enfermedad. Otra zona de replicación poco conocida fue descrita por primera vez por Yamamoto et al. (2008), quienes observaron replicación viral en las células epidérmicas de las plumas, este hallazgo fue observado en patos y gansos domésticos, por lo que las plumas podrían ser otra fuente de infección.

6.3. Detectar mediante qPCR el virus de influenza aviar (H5N1), en órganos de aves marinas, ingresados a la Unidad de Morfología y Diagnóstico, entre los años 2015 a 2025

En la medición de la extracción de ARN se pudo analizar los valores de A260/A280, este valor es la absorbancia para determinar la concentración y pureza del ARN extraído (Chang et al., 2025), los resultados obtenidos fueron menores a 1.6, por lo que se sugiere

que las muestras estaban contaminadas con fenoles (proteínas) y no tenían la pureza óptima para realizar un correcto qPCR, el valor óptimo es igual o mayor a 1.8, aunque actualmente no hay un valor establecido, pero se considera aceptable sobre 1.5 (Banco nacional de ADN, 2024). Esto puede deberse a diversas variables, siendo uno de los principales la gran susceptibilidad del ARN a la degradación (Vasquez y Malmierca, 2020) y que la mayoría de las muestras fueron recolectadas hace un largo periodo de tiempo (10 años), la totalidad de las muestras estaban fijadas en formalina y se describe que la formalina degrada el ARN, por lo que la extracción de buena calidad se vuelve complicado (Lin et al., 2024), otro factor puede ser un mal protocolo de síntesis de ADNc (anexo 7), el tipo de PCR no era el adecuado, que los partidores de Pérez et al., 2012 no eran los adecuados, que hayan estado mal diseñados o las muestras estaban infectadas con otra cepa del virus (y el partidor es específico).

6.4. Asociar la presencia o ausencia de lesiones sugerentes de influenza aviar (H5N1) identificadas histopatológicamente, con la positividad o negatividad a la técnica qPCR, en órganos de aves marinas, ingresados a la Unidad de Morfología y Diagnóstico, entre los años 2015 a 2025

Si bien todas las muestras que se seleccionaron para qPCR presentaban lesiones sugerentes de IAAP, por lo mencionado en el punto 6.3, no hubo una extracción óptima de ARN. Esto imposibilitó la amplificación de material genético durante el qPCR, lo que, a su vez, impidió obtener valores Ct. Como consecuencia, todas las muestras resultaron negativas y no fue necesario hacer un control negativo y positivo.

Castro et al. (2024) obtuvieron muestras positivas a H5N1 en huevos embrionados con qRT-PCR, técnica muy similar qPCR usado en este estudio. Stoimenov et al. (2017) detectaron la presencia de H5N1 a través de rRT-PCR en tejidos de pulmón, tráquea, cloaca, cerebro y proventrículo de pelícanos dálmatas (*Pelecanus crispus*). Lo que tienen en común ambos estudios es que se hizo la prueba molecular con muestras frescas.

En cambio, Padilla et al. (2004) lograron detectar H5N2 (IAAP) a través de RT-PCR en tejido formolado e incluido en parafina de riñones, pulmones y encéfalos de pollos de engorda (*Arbos acres*). Además, estos tejidos se analizaron histopatológicamente, observándose una alta concordancia entre las lesiones histopatológicas sugerentes de

IAAP con el resultado del análisis molecular. Cabe destacar que en ese estudio se inocularon experimentalmente a los pollos analizados.

7. CONCLUSIÓN

En el objetivo 1 se observaron lesiones sugerentes de IAAP, tales como trastornos inflamatorios, circulatorios y necróticos. De estas lesiones destacó el infiltrado inflamatorio linfocitario y los trastornos circulatorios en pulmón e hígado. En el análisis estadístico se evidenció una asociación estadísticamente significativa entre los órganos afectados y los trastornos inflamatorios y circulatorios.

Sobre el objetivo 2, en los trastornos inflamatorios y necróticos las especies más afectadas fueron la gaviota dominicana (*Larus dominicanus*) y el pingüino (*Spheniscus sp.*). En el trastorno circulatorio el órgano más afectado fue el pulmón. En los trastornos degenerativos y del crecimiento, el órgano más afectado fue el intestino, no obstante, estas lesiones podían ser sugerente de otras patologías.

En cuanto al objetivo 3 y 4, las 13 muestras a las que se sometieron a qPCR, pese a tener lesiones sugerentes de IAAP resultaron negativas, esto debido a la calidad del ARN extraído. Debido a esto, no se pudo establecer una asociación entre las lesiones sugerentes y el resultado de la prueba molecular.

De acuerdo con las conclusiones anteriores y la hipótesis planteada, se rechaza la hipótesis, ya que al no haber amplificación de ADN en qPCR, no se pudo confirmar la presencia de H5N1 en los tejidos que presentaban hallazgos sugerentes de IAAP. Sin embargo, esto no descarta que las aves no hayan estado infectadas con IAAP, ya que pudo ser otra cepa, una degradación del ARN en el almacenamiento de la muestra, que los partidores o el tipo de PCR no eran los adecuados.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abou-Rawash, A., Abd El-Hamed, H., Abd-Ellatief, H. y Elsamanoudy, S. (2012). Recent outbreaks of highly pathogenic avian influenza virus in chickens and ducks in Egypt: Pathological study. *International Journal of Bioengineering and Life Sciences*, 6(5), 256-264. <https://doi.org/10.5281/zenodo.1061486>
- AbuBakar, U., Amrani, A., Kamarulzaman, F. A., Karsani, S. A., Hassandarvish, P. y Khairat, J. E. (2023). Avian Influenza Virus Tropism in Humans. *Viruses* 15(4), 1-27. <https://doi.org/10.3390/v15040833>
- Adlhoch, C., Fusaro, A., Gonzales, J., Kuiken, T., Maragon, S., Niqueux, É., Staubach, C., Terregino, C., Aznar, I., Muñoz, I. y Baldinelli, F. (2022). Avian influenza overview September-December 2022. *EFSA Journal*, 21(1), 1-63. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.7786>
- Adzic, B., Goletic, S., Pejovic, N., Vizi, A. y Yolshin, N. (2024). First case of highly pathogenic avian influenza H5N1 in Montenegro. *Acta Veterinaria*, 74(1), 145-158. <http://dx.doi.org/10.2478/acve-2024-0011>
- Alexander, D. J. (2000). Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Revue Scientifique et Technique*, 19(2), 443-462. <http://dx.doi.org/leig10.20506/rst.19.2.1231>
- Almeida, J. S. (2006). *Gripe aviar: los impactos comerciales de las barreras sanitarias y los desafíos para América Latina y el Caribe* (1a ed.). Naciones Unidas, CEPAL, División de Comercio Internacional e Integración. <https://n9.cl/1h6qr>
- Amundson, C. L., Traub, N. J., Smith-Herron, A. J. y Flint, P. L. (2016). Helminth community structure in two species of arctic-breeding waterfowl. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 5(3), 263-272. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijppaw.2016.09.002>
- Bae, Y., Joh, S., Park, S., Kwon, H., Lee, Y., Lee, E., Song, B., Lee, Y., Heo, G., Lee, H., Kwon, Y., Lee, K. y Kim, J. (2018). Pathological lesions and antigen localization in chicken, ducks and Japanese quail naturally infected by novel highly pathogenic avian influenza (H5N6), Korea, 2016. *Journal of the Preventive Veterinary Medicine*, 42(3), 91-98. <https://doi.org/10.13041/jpvm.2018.42.3.91>
- Banco nacional de ADN. (2024). *Programa de control de calidad de ácidos nucleicos*. <https://www.bancoadn.org/docs/formulario-control-calidad-muestras.pdf>
- BirdLife International. (2016). *Numenius phaeopus. The IUCN Red List of Threatened Species*. <https://n9.cl/c4c1i>

- Bonita, R., Beaglehole, R. y Kjellström, T. (2008). *Epidemiología básica* (2a ed.). Organización Panamericana de la Salud. <https://n9.cl/lo68m>
- Boulinier, T., Kada, S., Ponchon, A., Dupraz, M., Dietrich, M., Gamble, A., Bourret, V., Duriez, O., Bazire, R., Tornos, J., Tveraa, T., Chambert, T., Garnier, R. y McCoy, K. (2016). Migration, Prospecting, Dispersal? What Host Movement Matters for Infectious Agent Circulation?. *Integrative and Comparative Biology* 56(2), 330-342. <https://doi.org/10.1093/icb/icw015>
- Caplonch, P. (2018). UN PANORAMA DE LAS MIGRACIONES DE AVES EN ARGENTINA. *Hornero*, 33(1), 1-18. <https://n9.cl/m2zng>
- Castro, G., González, R., Callupe, A., Apaza, A., Jara, J., Silva, W., Icochea, E. y More, J. (2024). Highly pathogenic avian influenza virus H5N1 clase 2.3.4.4b from Perú forms a monophyletic group with Chilean isolates in South America. <http://bit.ly/4ludGR0>
- Chang, Y., Li, T., Niu, Y., Guan, X. y Xie, Y. (2025). Comparative evaluation of proteinase K and dithiothreitol as pretreatments for extracting nucleic acids from respiratory samples for multiplex PCR. *BCM Microbiology*, 25(233), 1-8. <https://doi.org/10.1186/s12866-025-03956-y>
- Chesser, R. T. (1994). Migration in South America: an overview of the austral system. *Bird Conservation International*, 4(2-3), 91-107. <https://n9.cl/387t4>
- Chomel, B. B. (2014). Zoonoses. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.02426-0>
- Contreras, G. S. P. y Llanos, S. A. Influenza aviar H5N1. ¿Debemos preocuparnos?. *Revista chilena de infectología*, 40(3), 266-269. <http://dx.doi.org/10.4067/s0716-10182023000300266>
- Correa, N., Abarzúa, I., Aldana, G., Campodónico, P., Corvalán, L., Del Río, R., Pérez, M. y Ziegler, A. (2019). *Manual de Bioseguridad*. <https://n9.cl/3ujr8>
- De Matos, A. M. R. N., Domit, C y Bracarense, A. P. F. R. L. (2020). Seabirds: studies with parasitofauna and potential indicator for environmental anthropogenic impacts. *Semina: Ciências Agrárias*, 41(4), 1439-1450. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2020v41n4p1439>
- Decreto N° 389. Establece enfermedades de declaración obligatoria para la aplicación de medidas sanitarias y deroga decretos que indica. (21 de noviembre de 2014). En Biblioteca del Congreso Nacional. <https://bcn.cl/3lru9>
- Fu, X., Wang, Q., Ma, B., Zhang, B., Sun, K., Yu, X., Ye, Z. y Zhang, M. (2023). Advances in Detection Techniques for the H5N1 Avian Influenza Virus. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(4), 1-19. <https://doi.org/10.3390/ijms242417157>
- Gartner, P. y Hiatt, J. (2011). *Histología básica*. Elsevier. <https://n9.cl/4yku4>
- Hedley, J. (2015). Neurologic Diseases of Birds and Reptiles. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 24(1), 6-20. <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2014.12.004>

- Hernández-Sampieri, R. y Mendoza, C. P. (2018). *Metodología de la investigación: las rutas cuantitativa, cualitativa y mixta*. McGraw Hill. https://ldigital-uss-cl.bdigitaluss.remotexs.co/ebooks/51695-Metodologia_de_la_investigacion/
- Herrero-Uribe, L. (2008). El virus influenza y la gripe aviar. *Acta Médica Costarricense*, 50(1), 13-19. <https://n9.cl/dbaee>
- Hsueh, C., Fasina, O., Piñeyro, P., Ruden, R., El-Gazzar, M. y Sato, Y. (2024). Histopathologic features and viral antigen distribution of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus clade 2.3.4.4b from the 2022-2023 outbreak in Iowa wild birds. *Avian Diseases*, 68(3), 272-281. <https://doi.org/10.1637/aviandiseases-D-23-00085>
- Isaac, U., Oyo-Ita, E., Igwe, N. y Ije, E. (2023). Preparation of histology slides and photomicrographs: Indispensable techniques in anatomic education. *Anatomy Journal of Africa*, 12(1), 2252-2262. <https://doi.org/10.4314/aja.v12i1.1>
- Jordan, A. B., Gongora, V., Hartley, D. y Oura, C. (2018). A Review of Eight High-Priority, Economically Important Viral Pathogens of Poultry within the Caribbean Region. *Veterinary sciences*, 5(1), 14. <http://dx.doi.org/10.3390/vetsci5010014>
- Khan, J. S., Provencher, J. F., Forbes, M. R., Mallory, M. L., Lebarbenchon, C. y McCoy, K. D. (2019). Parasites of seabirds: A survey of effects and ecological implications. *Advances in Marine Biology*, 82, 1-50. <https://doi.org/10.1016/bs.amb.2019.02.001>
- Korteweg, C. y Gu, J. (2008). Pathology, Molecular Biology, and Pathogenesis of Avian Influenza A (H5N1) Infection in Humans. *The American Journal of Pathology*, 172(5), 1155-1170. <https://n9.cl/avatf>
- Landman, M., Scheibner, D., Graaf, A., Gischke, M., Koethe, S., Fatola, O., Raddatz, B., Mettenleiter, C., Beer, M., Grund, C., Harder, T., Abdelwhab, E. y Ulrich, R. (2021). A semiquantitative scoring system for histopathological and immunohistochemical assessment of lesions and tissue tropism in avian influenza. *Viruses*, 13(5), 868-888. <https://www.mdpi.com/1999-4915/13/5/868>
- Lang, A. S., Lebarbenchon, C., Ramey, A. M., Robertson, G. J., Waldenström, J. y Wille, M. (2016). Assessing the Role of Seabirds in the Ecology of Influenza A Viruses. *Avian Diseases* 60(1), 378-386. <http://dx.doi.org/10.1637/11135-050815-RegR>
- Lean, F., Falchieri, M., Furman, N., Tyler, G., Robinson, C., Holmes, P., Reid, S., Banyard, A., Brown, I., Catherine, M. y Núñez, A. (2023). *Highly pathogenic avian influenza virus H5N1 infection in skua and gulls in the United Kingdom, 2022*. <https://doi.org/10.1177/03009858231217224>
- Leguia, M., Garcia, A., Muñoz, B., Juarez, D., Barrera, P., Calvo, C., Jara, J., Silva, W., Ploog, K., Amaro, L., Colchao, P., Johnson, C., Uhart, M., Nelson, M. y Lescano, J. (2023). *Highly pathogenic avian influenza A (H5N1) in marine mammals and seabirds in Peru*. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41182-0>
- Leidez, J., y Arroyo, J. (2024). A database of foraging guilds of seabirds. <https://doi.org/10.32942/X29C9M>

- Leighton, F. y Heckert, R. (2007). Newcastle Disease and Related Avian Paramyxoviruses. En N. J. Thomas, D. B. Hunter y C. T. Atkinson (Eds.), *Infectious Diseases of Wild Birds*. Blackwell Publishing. <https://n9.cl/6hec0>
- Lin, Y., Dong, Z., Ye, T., Yang, J., Xie, M., Luo, J., Gao, J. y Gou, A. (2024). Optimization of FFPE preparation and identification of gene attributes associated with RNA degradation. *NAR Genomics and Bioinformatics*, 6(1), 1-11. <http://bit.ly/4l1tk6p>
- Majó, N. y Dolz R. (2011). *Atlas de la necropsia aviar*. Servet.
- Martínez, M., Sánchez-Villegas, A., Toledo, E. y Faulin, J. (2014). *Bioestadística amigable* (3a ed.). Elsevier. https://ldigital-uss-cl.bdigitaluss.remotexs.co/ebooks/46919-Bioestadistica_amigable/
- Martínez-Piña, D. (2023). *Aves de Chile, Guía de campo*. Museo Ediciones.
- Mathieu, C., Moreno, V., Pedersen, J., Jeria, J., Agredo, M., Gutiérrez, C., García, A., Vásquez, M. y Avalos, P. (2015). Avian Influenza in wild birds from Chile, 2007-2009. *Virus research*, 199, 42-45. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.01.008>
- Max, V., mra, J., Moreira, R. y Rojas, H. (2006). Avian Influenza in Chile: A successful Experience. *Avian Diseases*, 51(1), 363-365. <https://doi.org/10.1637/7631-042806R1.1>
- Mirhosseini, Z. y Khosravi, A. (2023). Fungal Pathogens: Emerging Threats to Bird and Human Health, Assessment the Relative Frequency of Pathogenic Fungi in Ornamental Bird Feces. *Journal of Poultry Science and Avian Diseases*, 1(4), 20-24. <http://dx.doi.org/10.61838/kman.jpsad.1.4.4>
- Mosad, S., El-Gohary, F., Said, H., El-Sharkawy, H. y Kotb, E. (2020). Pathological and molecular characterization of H5 avian influenza virus in poultry flocks from Egypt over a ten-year period (2009-2019). *Animals*, 10(6), 1-14. <http://dx.doi.org/10.3390/ani10061010>
- Muena, J. y Vera, F. (2021). *Manual de procedimientos del laboratorio de histopatología veterinaria*.
- Myers, J. P., Morrison, R. I. G., Antas, P., Harrington, B., Lovejoy, T., Sallaberry, M., Senner, S. y Tarak, A. (1987). Conservation Strategy for Migratory Species. *American Scientist* 75(1), 19-26. <https://n9.cl/6er7qx>
- Network of expertise on animal influenza. (2023). *Continued expansion of high pathogenicity avian influenza H5 in wildlife in South America and incursion into the Antarctic region*. <https://www.offlu.org/wp-content/uploads/2023/12/OFFLU-wildlife-statement-no.-II.pdf>
- Oficina de Estudios y Políticas Agrarias (2024) *Situación de la Influenza Aviar en Chile, 2023*. <https://n9.cl/fbf7t>
- Organización Mundial de la Salud. (2023). *Infección humana por el virus de la gripe aviar A (H5) – Chile*. Consultado el 22 de agosto de 2024, de <https://www.who.int/es/emergencies/diseases-outbreak-news/item/2023-DON453>

- Padilla, R., Aburto, E., Fraire, M. y Padilla, L. (2004). Influenza Aviar: histopatología y detección viral por RT-PCR en tejidos fijados con formalina e incluidos en parafina. *Veterinaria México*, 35(1), 1-18. <https://n9.cl/diinx>
- Paleczny, M., Hammill, E., Karpouzi, V. y Pauly, D. (2015). *Population Trend of the World's Monitored Seabirds, 1950-2010*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129342>
- Pérez, L., Díaz de Arce, H., Cilloni, F., Salviato, A., Marciano, S., Perera, C.L., Salmoni, A., Beato, M.S., Romero, A., Capua, I. y Cattoli, G. (2012). An SYBR Green-based real-time RT-PCR assay for the detection of H5 hemagglutinin subtype avian influenza virus. *Molecular and Cellular Probes*, 26(3), 137-145. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2012.02.001>
- Perkins, L. y Swayne, D. (2001). Pathobiology of A/Chicken/Hong Kong/220/97 (H5N1) Avian influenza virus in seven gallinaceous species. *Veterinary Pathology*, 38(2), 149-164. <https://doi.org/10.1354/vp.38-2-149>
- Petracci, F., Canevari, M. y Bremer, E. (2005). *Guía de Aves Playeras y Marinas migratorias del Sur de América del Sur*. <https://n9.cl/vsoky>
- Poveda, J. (2023). *Manual de laboratorio de técnica histológica*.
- Rae, M. A. (2006). Diagnostic Value of Necropsy. En G. J. Harrison y T. L. Lightfoot (eds.), *Clinical Avian Medicine volume II* (pp. 661-678). Spix Publishing, Inc.
- Ramis, A., van Amerongen, G., van de Bildt, M., Leijten, L., Vanderstichel, R., Osterhaus, A. y Kuiken, T. (2014). Experimental infection of highly pathogenic avian influenza virus H5N1 en black-headed gulls (*Chroicocephalus ridibundus*). *Veterinary Research*, 45(84), 1-10. <http://www.veterinaryresearch.org/content/45/1/84>
- Real Academia Española. (2023). Zoonosis. Consultado el 17 de agosto de 2024, de <https://dle.rae.es/zoonosis>
- Rhyoo, M., Lee, K., Moon, O., Park, W., Bae, Y., Jung, J., Yoon, S., Kim, H., Lee, M., Lee, E., Ki, M. y Jeong, K. (2015). Analysis of signs and pathology of H5N1-infected ducks from the 2010-2011 Korean highly pathogenic avian influenza outbreak suggests the influence of age and management practices on severity of disease. *Avian Pathology*, 44(3), 175-181. <https://doi.org/10.1080/03079457.2015.1021295>
- Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura. (2023). *Influenza Aviar*. Consultado el 3 de octubre de 2024, de <https://www.sernapesca.cl/influenza-aviar/#>
- Soto, N., Maldonado, J., Zambrano, D., Molina, R., Müller, C., Rodríguez, D., Monfil, V y Soto, B. (2023). *Primer registro de influenza aviar de alta patogenicidad en *Leopardus geoffroyi* (Felidae)*. <https://n9.cl/osu0u>
- Spackman, E y Killian, M. (2020). Detection of Influenza A in Avian Samples by ELISA. En E. Spackman (Eds.,), *Animal Influenza Virus: Methods and Protocols* (3a ed., pp. 177-193). Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0346-8>

- Spackman, E. (2020). A Brief Introduction to Avian Influenza Virus. En E. Spackman (Eds.,), *Animal Influenza Virus: Methods and Protocols* (3a ed., pp. 83-99). Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0346-8>
- Spackman, E. (2020). A Brief Introduction to Avian Influenza Virus. En E. Spackman (Eds.,), *Avian Influenza Virus Detection and Quantitation by Real-Time RT-PCR* (3a ed., pp. 137-148). Humana Press. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0346-8>
- Stoimenov, G., Goujgoulova, G., Nikolov, B., Petrova, R., Teneva, A. y Dimitrova, I. (2017). Histopathological findings in Dalmatian pelicans (*Pelecanus crispus*) naturally infected with avian influenza subtype A H5N1 in Bulgaria. *Journal of the Hellenic veterinary medical society*, 68(3), 369-376. <https://doi.org/10.12681/jhvms.15493>
- Strafuss, A. C. (1988). *Necropsy: Procedures and Basic Diagnostic Methods For Practicing Veterinarians*. Charles C Thomas Publisher.
- Suba, S., Nagarajan, S., Saxena, VK., Kumar, M., Vanamayya, PR., Rajukumar, K., Gowthaman, V., Jain, R., Singh, DP. y Dubey, SC. (2014). Pathology of H5N1, highly pathogenic avian influenza virus, in two Indian native chicken breeds and a synthetic broiler line. *Indian Journal of Experimental Biology*, 53(4), 202-207. <http://bit.ly/442zkpF>
- Swayne, D. E. y Pantin-Jackwood, M. (2008). Pathobiology of Avian Influenza Virus Infections in Birds an Mammals. En D. E. Swayne (Eds.), *Avian Influenza* (pp. 87-122). Blackwell Publishing. <https://doi.org/10.1002/9780813818634.ch1>
- Tala, C. (2006). Qué hacen aquí esas gaviotas... qué hacen aquí, tan lejos de su lugar natal. *Boletín Veterinario Oficial*, 5(1), 1-24. <https://n9.cl/f16d1g>
- Teifke, J., Klopfleisch, R., Globig, A., Starick, E., Hoffmann, B., Wolf, P., Beer, M., Mettenleiter, T. y Harder, T. (2007). Pathology of natural infections by H5N1 highly pathogenic avian influenza virus in mute (*Cygnus olor*) and whooper (*Cygnus cygnus*) swans. *Veterinary Pathology*, 44(2), 137-143. <http://bit.ly/44jauRd>
- Universidad Nacional del Litoral. (2012). *Manual de procedimientos de laboratorio de investigaciones histológicas aplicadas*. Facultad de Ciencias Veterinarias.
- Vasquez, A. y Malmierca, E. (2020). Estabilidad del ARN viral en muestras clínicas para el diagnóstico viral. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 38(6), 293-298. <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-estabilidad-del-arn-viral-muestras-S0213005X1930299X>
- Wang, J., Ma, Z. B., Zeng, Z. L., Yang, X. W., Huang, Y. y Liu, J. H. (2017). The role of wildlife (wild birds) in the global transmission of antimicrobial resistance genes. *Zoological Research*, 38(2). 55-80. <https://dx.doi.org/10.24272/j.issn.2095-8137.2017.003>
- Webster, R., Yakhno, M., Hinshaw, V., Bean, W. y Gopal, K. (1978). Intestinal influenza: Replication and characterization of influenza viruses in ducks. *Virology*, 84(2), 268-278. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(78\)90247-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(78)90247-7)

Youvan, D. C. (2024). *Global Leaders in Avian Influenza Research: Contributions and Impact*. <https://doi.org/10.13140/rg.2.2.31429.05606>

Yumamoto, Y., Nakamura, K., Okamatsu, M., Yamada, M. y Mase, M. (2008). Avian influenza (H5N1) replication in feathers of domestic waterfowl. *Emerging infectious diseases*, 14(1), 149-151. <https://doi.org/10.3201/eid1401.071036>

9. ANEXOS

9.1. Anexo 1. Lista de verificación de necropsia, adaptado de “Clinical avian medicine” (Rae, 2006).

Owner's Name	Date of Necropsy		
Animal's Name	Date of Death		
Species	Euthanasia Method		
Age	Sex	Body Weight at Necropsy	
Band/Microchip #	Tattoo?		
Organ(s)	Normal	Abnormal	Description
Skin/Feathers			
Beak/Oral Cavity/Tongue			
Eyes/Ears/Conjunctivae			
Sinuses/Choana/Nasal Cavity			
Skeletal muscle/Bones/Joints			
Liver/Gall Bladder, if present			
Spleen			
Thyroids/Parathyroids			
Trachea/Lungs/Airsacs			
Kidneys/Adrenals			
Testes/Ovary/Oviduct			
Crop/Esophagus			
Proventriculus/Ventriculus			
Duodenum/Pancreas			
Jejunum/Ileum/Ceca, if present			
Colon/Cloaca			
Bursa/Thymus			
Brain/Meninges			
Spinal Cord/Vertebrae/Nerves			
Bone/bone marrow			
Middle & inner ear			
Heart/Great Vessels			
Gut contents wet mount results:			
Gut contents dried smear results:			
Organ impression smear results:			
Tissues in formalin:			
Tissues frozen:			

9.2. Anexo 2. Solicitud de necropsia USS.



UNIVERSIDAD
SAN SEBASTIÁN
VOCACIÓN POR LA EXCELENCIA



SOLICITUD DE NECROPSIA

Nº FOLIO:
(necropsia)

Fecha de ingreso: ___/___/___

I. Antecedentes Generales

Propietario:

Teléfono: E-mail:

Solicitado por Dr.(a):

Procedencia: Vet. Menor Vet. Mayor CEREFAS Vet. Externa

Tipo pago: Servicio Docencia Convenio

II. Antecedentes del PACIENTE

Nombre:

Nº ficha Clínica:

Especie:

Raza:

Sexo: Macho Hembra Indeterminado

Edad: años meses días

Peso (aprox.):

Color (aprox.):

Fecha de muerte: ___/___/___

III. Tipo de estudio y muestra(s):

Nº de folio histopatológico:

Fecha extracción de muestra: ___/___/___

Tejidos u órganos:

Parásitos:

Otros:

Firma autorización propietario

Firma Médico Veterinario

9.3. Anexo 3. Procedimientos técnicos de histología, adaptado de “Manual de procedimientos del laboratorio de histología veterinaria” (Muena y Vera, 2021).

2. Procedimientos Técnicos

2.1 Fijación Tisular:

La fijación de tejidos o células consiste en la detención de los procesos de putrefacción y autólisis que inician inmediatamente después de la muerte, estos pueden producir cambios morfológicos y estructurales indeseados para el correcto análisis y diagnóstico. Por tanto, el tiempo que transcurre desde la toma de muestra hasta el contacto con el fijador debe ser el mínimo posible.

Existen métodos de fijación físicos y químicos, siendo los más efectivos los de tipo químicos, entonces hablaremos principalmente de líquidos fijadores. Si bien existen diversos tipos de líquidos fijadores, en el Laboratorio de Histopatología veterinaria de la USS utilizamos el fijador de rutina, es decir, Formalina al 10% neutralizada.

El Formaldehído comercialmente obtenido al 37 o 40%, es un fijador que forma enlaces con las proteínas de los tejidos y su efecto es conseguido de forma segura cuando es diluido con agua al 10%. Por tanto, de la solución comercial se diluye 1 parte del fijador en 9 partes de agua y es neutralizado a saturación con carbonato de calcio, esta mezcla es conocida como formol o formalina al 10% neutralizada. La preparación debe ser con elementos de protección y bajo campana de extracción de gases.

Para lograr una correcta fijación de la muestra se debe tener en cuenta que la proporción muestra fijador debe ser 1:10 y el tiempo que demora en fijar depende del tamaño de la misma muestra, por tanto, para muestras mas pequeñas (menos a 5 mm) deben permanecer embebidas en formalina por al menos 24 horas a temperatura ambiente.

Otro fijador en el laboratorio es el metanol, este es utilizado para fijar los extendidos citológicos. Y su manipulación es mínima, su forma comercial esta lista para usar, los portaobjetos se sumergen por unos segundos en el líquido y se dejan secar al aire.

2.2 Microscopía y Dictado:

Corresponde al inicio del procesamiento histopatológico, se realiza a muestras provenientes de biopsias o necropsias que han cumplido con el tiempo óptimo de fijación. Este ítem es importante para guiar al análisis y posterior diagnóstico del caso.

Es llevado a cabo por el MV Patólogo en conjunto con la TM, en este paso el médico observa macroscópicamente y hace una descripción de la muestra en cuanto a forma, color, consistencia y otros, además se realiza medición del tamaño y registro fotográfico. La TM toma dictado y anota los antecedentes en la hoja de solicitud del caso.

Por último, el MV Patólogo procede a seccionar la/las muestras y selecciona uno o más fragmentos de aproximadamente 2 mm de espesor que será representativo de la lesión, se encapsulan en histocassette de plástico identificados con el número de caso correspondiente para continuar con el procesamiento.

2.3 Inclusión de la muestra:

Este paso del procesamiento histológico tiene por objetivo reemplazar toda el agua del interior del tejido por un medio más consistente, en este caso se forman tacos de parafina que contienen en su interior la muestra de tejido. Esto permitirá obtener cortes de tejido finos (3 a 5 μm) y seriados para ser observados bajo el microscopio óptico.

La inclusión requiere de una serie de sub-pasos para lograr su propósito final:

- a) Deshidratación: se realiza con una batería de alcoholes etílicos ascendente (70°, 95° y 100°), las muestras se sumergen en cada estación.
- b) Aclaramiento: se utiliza xilol, un líquido intermediario que es miscible tanto con el alcohol absoluto como con la parafina, las muestras son sumergidas en este líquido que además proporciona al tejido un poco de transparencia.
- c) Impregnación o infiltración: con parafina en estado líquido, a altas temperaturas (58 a 65 °C), las muestras son sumergidas para que la parafina ingrese en su interior.
- d) Formación del tajo o molde: posterior a la completa infiltración y con la ayuda de moldes de metal, la muestra se introduce en parafina que será sólida a temperatura ambiente.

2.4 Microtomía:

Consiste en obtener cortes finos y seriados, idealmente de no mas 5 μm de espesor y obteniendo una cinta de parafina con tejido. Para lograr este paso se utiliza el micrótomo, un instrumento mecánico y de precisión que permite obtener este tipo de cortes. En el Laboratorio contamos con un microtomo de rotación, lo que significa que la muestra es móvil y la navaja de corte fija.

Una vez obtenidos los cortes, las cintas deben ser estiradas sobre agua tibia (40 °C aprox.) que se mantiene en un recipiente eléctrico llamado baño de flotación. La temperatura del agua permite calentar la parafina junto con el tejido y así estirar los cortes, permitiendo como parte final de esta etapa adherir los cortes sobre portaobjetos que se dejan secar en estufa a 70 °C por mínimo una hora.

2.5 Desparafinación:

Es el proceso mediante el cual se retira toda la parafina del tejido, infiltrada y que encapsula. La parafina no permite el ingreso de los colorantes hacia el tejido, entonces se utiliza xilol que en este caso disuelve el medio consistente dejando solo el tejido adherido al vidrio.

Este proceso termina una vez que la muestra de tejido es nuevamente hidratada, para esto se sumergen los portaobjetos en una batería de alcoholes descendente (100°, 95° y 70°) que finaliza con agua destilada.

9.4. Anexo 4. Coloración Núcleo-Citoplasmática, adaptado de “Manual de laboratorio de técnica histológica” (Poveda, 2023).

57

ACTIVIDADES DE LABORATORIO

Objetivo General:

Conocer y preparar la tinción de rutina utilizada para el estudio de tejidos y luego teñir algunas muestras identificando basofilia y ácidofilia.

Coloración Núcleo-Citoplasmática

La Hematoxilina –Eosina (HE) Se considera de rutina. Se hace actuar sucesivamente un colorante nuclear (cationico) y un colorante citoplasmático (aniónico).

Procedimiento:

Desparafinar los cortes e hidratar hasta el agua mediante los siguientes pasos:

Xilol I	5 minutos
Xilol II	5 minutos
Xilol III	5 minutos
Alcohol 100 % I	1 - 5 minutos
Alcohol 100% II	1 - 5 minutos
Alcohol 95% I	1 - 5 minutos
Alcohol 95% II	1 - 5 minutos
Alcohol 70%	1 - 5 minutos
Alcohol 50%	1 - 5 minutos

Nota: Despues de cada paso dejar escurrir el exceso de líquido.

Lavar en agua destilada 5 minutos.

Tinción nuclear:

Se puede utilizar diversos tipos de Hematoxilina. (Hemalumbre de Mayer, de Lillie, de Harris, etc.)

- Hematoxilina 5g
- Alcohol 100% 50ml
- Alumbre de Potasio y de Amonio 100g
- Agua destilada 1000ml
- Oxido de rojo de Mercurio 2,5g

Procedimiento:

- Disolver la Hematoxilina en Alcohol absoluto.
- Calentar el agua en platina caliente y agregar el alumbre. Una vez que haya soltado el hervor retirar del fuego. Una vez que el alumbre este bien disuelto, agregar suavemente la hematoxilina. Agitar con cuidado (recuerde que el contenedor de la solución está caliente)
- Colocar en platina caliente nuevamente, una vez que hierva retirar y dejar enfriar un poco, agregar **con precaución**, en pequeñas cantidades, el Óxido de Mercurio. Agitar con precaución y dejar que se entibie. Cambiar a envase definitivo la solución.
- Una vez que están hidratados los cortes, colocar las láminas en la solución de hematoxilina, la solución se debe filtrar, siempre que se observe en la superficie una delgada "nata", dependiendo del método que use para realizar la tinción, será el tiempo que las láminas permanezcan dentro de la cubeta de hematoxilina.
 - Regresivo, en este caso se realiza una sobretinción nuclear, donde las láminas permanecen alrededor de 5 minutos en la cubeta de tinción, para luego ser lavadas con agua corriente y diferenciadas en alcohol acido (OH-HCl 0,5%), esta solución permitirá extraer el

Colorante, lo que se debe controlar al microscopio, vigilando que solo los núcleos estén teñidos.

- Progresivo, en este método, el tiempo de tinción es relativo, puede ir desde los 15 segundos a 1 minuto el tiempo de tinción óptimo (si la hematoxilina está recientemente preparada). De esta forma primero se deja 15 segundos, se lava y se observa al microscopio, buscando que los núcleos tengan una tinción adecuada.
- Lavado abundante en agua corriente. (este paso se hace para azulizar los tejidos)
- Pasar los cortes por agua destilada.
- Lavado en agua corriente (10 minutos)
- Lavado en agua destilada. (solo una pasada)

Nota:

Si se desea apresurar el viraje o azulamiento se deberá hacer inmersiones en Amoniaco 3% hasta que las muestras se tornen azules. Luego lavar abundantemente en agua para que no queden restos de amoniaco.

2.- Tinción citoplasmática

Esta se realiza generalmente con eosina al 1%, o bien una mezcla de eosina-floxina al 0.5%, en proporciones de 1:1

Preparación de la eosina:

Disolver 1g de **Eosina** Y alcohólica.

Procedimiento:

- Una vez realizada la tinción nuclear, se procede a la tinción del citoplasma:
- Colocar los cortes en la solución de eosina por 30 seg. a 3 minutos
- Lavado rápido en agua destilada, sólo para retirar exceso de colorante
- Pasar por alcoholes ascendentes para deshidratar el corte.

Deshidratación	
Alcohol de 70%	10 segundos
Alcohol de 95%	2 minutos
Alcohol de 95%	2 minutos
Alcohol de 100%	2 minutos
Alcohol de 100%	2 minutos
Aclarar	
Xilol I	2 minutos
Xilol II	2 minutos
Xilol III	2 minutos
Montar en resina sintética.	

Resultados:

- ✓ Núcleos azules
- ✓ Citoplasma y otros elementos acidófilos rosa a rojo

Nota: La Hematoxilina es un colorante versátil y ampliamente usado en técnicas histológicas. Se emplean para demostrar núcleo celular, mielina, fibras elásticas, fibrina, neuroglia, estriaciones musculares, etc.

Entre las Hematoxilinas o Hemateina posibles de ser utilizadas con este propósito se recomienda la Hematoxilina de Harris, como técnica de rutina, que contrasta bien los núcleos, dando un fondo totalmente incoloro cuando se halla bien acetificada la solución.

En relación a la coloración con Eosina hay autores que prefieren utilizar soluciones alcohólicas o acuosas. Este colorante da diversas tonalidades a la coloración citoplasmática, así por ej. La Eosina B y Eritrosina B dan un tinte rosa- azulado a la coloración, mientras que la Floxina B da un tono rojo más profundo y la Eosina Y rosa Amarillento.

9.5. Anexo 5. Tablas de histoscore, adaptado por Gabriel Fernández (2024).

Tabla 2. Graduación de Histoscore para Inflamación.

INFLAMACIÓN		
Ausente	0	Sin presencia de células inflamatorias
Leve	1	Presencia de foco de infiltración de células inflamatorias.
Moderada	2	Presencia de infiltrado de células inflamatorias multifocal.
Severa	3	Infiltración de células inflamatorias difusa que abarca gran parte del tejido afectando la estructura normal.

Fuente: Adaptado de Hallazgos Histopatológicos En Órganos De Ejemplares De Visón (*Neovison Vison*) De Las Regiones De Los Ríos Y Los Lagos, por C. Barria, 2023. Derechos Reservados 2023 para Universidad San Sebastián.

Tabla 3. Graduación de Histoscore para Necrosis.

NECRÓTICOS		
Ausente	0	Sin presencia de núcleos picnóticos.
Leve	1	Picnosis focal.
Moderada	2	Picnosis multifocal.
Severa	3	Picnosis difusa, abarca gran parte del tejido.

Fuente: Adaptado de Hallazgos Histopatológicos En Órganos De Ejemplares De Visón (*Neovison Vison*) De Las Regiones De Los Ríos Y Los Lagos, por C. Barria, 2023. Derechos Reservados 2023 para Universidad San Sebastián.

Tabla 4. Graduación de Histoscore para Trastornos Circulatorios.

CIRCULATORIOS		
Ausente	0	Sin presencia de lesiones circulatorias.
Leve	1	Lesión circulatoria focal.
Moderada	2	Lesiones circulatorias multifocales o de distinto origen.
Severa	3	Lesiones circulatorias de distinto origen y que abarcan gran parte del tejido.

Fuente: Adaptado de Hallazgos Histopatológicos En Órganos De Ejemplares De Visón (*Neovison Vison*) De Las Regiones De Los Ríos Y Los Lagos, por C. Barria, 2023. Derechos Reservados 2023 para Universidad San Sebastián.

Tabla 5. Graduación de Histoscore para Trastornos Degenerativos.

DEGENERATIVOS		
Ausente	0	Sin cambios degenerativos.
Leve	1	Lesión degenerativa focal.
Moderada	2	Degeneración multifocal con grado de infiltración moderada.
Severa	3	Degeneración severa, ocupando gran parte del tejido, de carácter irreversible.

Fuente: Modificado de Hallazgos Histopatológicos En Órganos De Ejemplares De Visón (*Neovison Vison*) De Las Regiones De Los Ríos Y Los Lagos, por C. Barria, 2023. Derechos Reservados 2023 para Universidad San Sebastián.

Tabla 6. Graduación de Histoscore para Trastornos del Crecimiento Celular.

DEL CRECIMIENTO CELULAR		
Ausente	0	Tejido sin anormalidad.
Leve	1	Cambios estructurales a nivel celular, de distribución focal en el tejido.
Moderada	2	Zonas multifocales con cambios en aspecto funcional y estructural a nivel celular.
Severa	3	Trastorno en estructura celular generalizado, abarcando gran parte del tejido.

Fuente: Modificado de Hallazgos Histopatológicos En Órganos De Ejemplares De Visón (*Neovison Vison*) De Las Regiones De Los Ríos Y Los Lagos, por C. Barria, 2023. Derechos Reservados 2023 para Universidad San Sebastián.

9.6. Anexo 6. Protocolo de extracción de ARN, adaptado de “E.Z.N.A.® FFPE RNA Kit” (Omega Bio-Tek, 2023).



Product Manual

innovations in nucleic acid isolation



E.Z.N.A.® FFPE RNA Kit

R6954-00 5 preps

R6954-01 50 preps

Manual Date: June 2023
Revision Number: v7.0

For Research Use Only

📍 Omega Bio-tek, Inc.
400 Pinnacle Way, Suite 450
Norcross, GA 30071
✉️ www.omegabiotek.com

📞 770-931-8400
📞 770-931-0230
✉️ info@omegabiotek.com

🔗 [omega-bio-tek](https://www.linkedin.com/company/omega-bio-tek/)
🔗 [omegabiotek](https://www.instagram.com/omegabiotek/)
🔗 [omegabiotek](https://www.facebook.com/omegabiotek/)

6.7. Anexo 7. Protocolo para enzima M-MLV (Promega, 2024).



Usage Information

1. Description

Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT) is an RNA-dependent DNA polymerase that can be used in cDNA synthesis with long messenger RNA templates (>5kb). M-MLV RT is the preferred reverse transcriptase for long mRNA templates because the RNase H activity of M-MLV RT is weaker than the commonly used Avian Myeloblastosis Virus (AMV) reverse transcriptase.

Application of M-MLV RT includes:

- First-strand cDNA synthesis from RNA molecules

Note: M-MLV Reverse Transcriptase is less processive than AMV Reverse Transcriptase, and therefore, more units of the M-MLV enzyme are required to generate the same amount of cDNA as in the AMV reaction.

2. First-Strand cDNA Synthesis

Materials to Be Supplied by the User

(Buffer composition provided in Section 3.)

- Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor (Cat.# N2511)
- dATP, 10mM (Cat.# U1201, 100mM)
- dCTP, 10mM (Cat.# U1221, 100mM)
- dGTP, 10mM (Cat.# U1211, 100mM)
- dTTP, 10mM (Cat.# U1231, 100mM)
- Nuclease-Free Water (Cat.# P1193)

1. The following procedure uses 2 μ g of total RNA. In a sterile RNase-free microcentrifuge tube, add 0.5 μ g of the primer or primer-adaptor per microgram of the total RNA sample in a total volume of \leq 13.38 μ l in water. Heat the tube to 70°C for 5 minutes to melt secondary structure within the template. Cool the tube immediately on ice to prevent secondary structure from reforming, then spin briefly to collect the solution at the bottom of the tube.

2. Add the following components to the annealed primer/template in the order shown.

Note: Do not alter the ratio of primer to RNA.

M-MLV 5X Reaction Buffer	5.00 μ l
dATP, 10mM	1.25 μ l
dCTP, 10mM	1.25 μ l
dGTP, 10mM	1.25 μ l
dTTP, 10mM	1.25 μ l
Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor	25 units
M-MLV RT	200 units
Nuclease-Free Water to final volume	25.00 μ l

3. Mix gently by flicking the tube, and incubate for 60 minutes at 37°C for random primers or 42°C for other primers or primer-adaptors. The extension temperature may be optimized between 37°C and 42°C.
4. Perform second-strand synthesis using a protocol of your choice. Standard protocols for second-strand synthesis may be found in reference 2.

Note: The M-MLV RT Reaction Buffer is compatible with enzymes used in a number of downstream applications. Phenol extractions and ethanol precipitations typically are not necessary before performing second-strand synthesis and amplification.

3. Composition of Buffer

M-MLV RT 5X Reaction Buffer (provided)

250mM	Tris-HCl (pH 8.3 at 25°C)
375mM	KCl
15mM	MgCl ₂
50mM	DTT

4. References

1. Roth, M.J., Tanese, N. and Goff, S.P. (1985) Purification and characterization of murine retroviral reverse transcriptase expressed in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **260**, 9326–35.
2. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 8.64.

9.8. Anexo 8. Protocolo para el reactivo Briliant® II SYBR® Green qPCR Master Mix (Stratagene, 2007).

PROTOCOL

Preparing the Reactions

Notes Once the tube containing the Briliant II SYBR Green QPCR master mix is thawed, store it on ice while setting up the reactions. Following initial thawing of the master mix, store the unused portion at 4°C. Multiple freeze-thaw cycles should be avoided. SYBR Green I dye (present in the master mix) is light-sensitive; solutions containing the master mix should be protected from light whenever possible.

It is prudent to set up a no-template control reaction to screen for contamination of reagents or false amplification.

1. If the reference dye will be included in the reaction, (optional), dilute the dye solution provided 1:500 (Mx3000P, Mx3005P, and Mx4000 instruments) or 1:50 (ABI PRISM 7700 and ABI 7900HT instruments) using nuclease-free PCR-grade H₂O. For other instruments, use the guidelines in the *Reference Dye* section under *Preprotocol Considerations*. Keep all solutions containing the reference dye protected from light.

Note If using a system other than the Mx3000P, Mx3005P or Mx4000 instruments, the use of the reference dye may be required for optimal results.

2. Prepare the experimental reactions by combining the following components *in order*. Stratagene recommends preparing a single reagent mixture for duplicate experimental reactions and duplicate no-template-controls (plus at least one reaction volume excess), using multiples of each component listed below.

Experimental Reaction

Nuclease-free PCR-grade water to adjust the final volume to 25 μ l (including experimental DNA)
12.5 μ l of 2x Briliant II SYBR Green QPCR master mix
 x μ l of upstream primer (200–600 nM final concentration)
 x μ l of downstream primer (200–600 nM final concentration)
0.375 μ l of diluted reference dye (optional)

Note A total reaction volume of 50 μ l may also be used.

3. Gently mix without creating bubbles (do not vortex), then distribute the mixture to the individual experimental reaction tubes.
4. Add x μ l of experimental gDNA, cDNA, or plasmid DNA to each reaction.

5. Gently mix the reactions without creating bubbles (do not vortex).

Note *Bubbles interfere with fluorescence detection.*

6. Centrifuge the reactions briefly.

PCR Cycling Programs

7. Place the reactions in the instrument and run one of the PCR programs listed below. Stratagene recommends a two-step cycling protocol for most primer/template systems. For targets <150 bp in length, the fast protocol with two-step cycling may be used to decrease run times without compromising amplification efficiency. For primers with low melting temperatures, the three-step cycling protocol may be optimal.

Recommended Protocol with Two-Step Cycling (All Targets)

Cycles	Duration of cycle	Temperature
1	10 minutes ^a	95°C
40	30 seconds	95°C
	1.0 minute ^b	60°C

^a Initial 10 minute incubation is required to activate the DNA polymerase.

^b Set the temperature cycler to detect and report fluorescence during the annealing/extension step of each cycle.

Fast Protocol with Two-Step Cycling (Targets <150 bp)

Cycles	Duration of cycle	Temperature
1	15 minutes ^a	95°C
40	10 seconds	95°C
	30 seconds ^b	60°C

^a Initial 15 minute incubation is required to activate the DNA polymerase.

^b Set the temperature cycler to detect and report fluorescence during the annealing/extension step of each cycle.

Alternative Protocol with Three-Step Cycling (All Targets)

Cycles	Duration of cycle	Temperature
1	10 minutes ^a	95°C
40	30 seconds	95°C
	1.0 minute ^b	50–60°C ^c
	30 seconds ^b	72°C

^a Initial 10 minute incubation is required to activate the DNA polymerase.

^b Set the temperature cycler to detect and report fluorescence during the annealing and extension step of each cycle.

^c Choose an appropriate annealing temperature for the primer set used.

9.9. Anexo 9. Permiso uso de muestras de Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura (SERNAPESCA).

Folio acta: 2024-DR10-007 (Año- N° oficina-Correlativo)

ACTA DE ENTREGA EN CUSTODIA DE ESPECIE MARINA PROTEGIDA

El Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura, hace entrega al Dr. Frank Alexis Vera Otárola, RUT N° 13.607.969-7, en representación de la Facultad de Ciencias de la Naturaleza, Universidad San Sebastián, Carrera de Medicina Veterinaria, Sede De La Patagonia, los especímenes que a continuación se detallan, para su custodia y con el fin de que sea utilizado para su recuperación, educación, divulgación y/o investigación científica:

Nombre científico del o los especímenes	Normativa De protección	Especificar si es un ejemplar vivo, sus partes o derivados. Describir partes y/o derivados.	Muestras en formalina al 10%
<i>Spheniscus magellanicus</i>		Cadáveres (10)	Sí
<i>Spheniscus humboldti</i>		Cadáveres (10)	Sí

Observaciones:

- El espécimen entregado no podrá ser utilizado para ningún fin comercial y en el caso de que sea recuperado, el Servicio determinará su destino final.
 - No podrá ser re-exportado por ningún otro motivo que no esté dentro del marco de una investigación científica reconocida por la autoridad competente.

El Sr. Frank Alexis Vera Otárola o la entidad receptora del o los especímenes, declara expresamente conocer y aceptar íntegramente toda la normativa relativa al tratamiento de los especímenes entregados y aquella que se consigna como Anexo del acta, y se obliga a respetarla cabalmente.

Con fe de lo anterior, firman el presente documento

Sr. Cristian Hudson Martignani
Director Regional
Servicio Nacional de Pesca y Acuicultura

Sr. Frank Alexis Vera Otárola
Institución: Universidad San Sebastián

Fecha: 21-01-2025

9.10. Anexo 10. Permiso uso de muestras de Servicio Agrícola y Ganadero (SAG).

Folio acta: (Año- N° Oficina-Correlativo)

ACTA DE ENTREGA EN CUSTODIA DE ESPECIE PROTEGIDA

El Servicio Agrícola y Ganadero, hace entrega al Dr. Frank Alexis Vera Otárola, RUT N° 13.607.969-7, en representación de la Facultad de Ciencias de la Naturaleza, Universidad San Sebastián, Carrera de Medicina Veterinaria, Sede De La Patagonia, los especímenes que a continuación se detallan, para su custodia y con el fin de que sea utilizado para su recuperación, educación, divulgación y/o investigación científica:

Nombre científico del o los especímenes	Normativa De protección	Especificar si es un ejemplar vivo, sus partes o derivados. Describir partes y/o derivados.	Muestras en formalina al 10%
<i>Larus dominicanus</i>		Cadáveres	Sí
<i>Chroicocephalus maculipennis</i>		Cadáveres	Sí
<i>Phalacrocorax carbo</i>		Cadáveres	Sí
<i>Pelecanus thagus</i>		Cadáveres	Sí

Observaciones:

- El espécimen entregado no podrá ser utilizado para ningún fin comercial y en el caso de que sea recuperado, el Servicio determinará su destino final.
 - No podrá ser re-exportado por ningún otro motivo que no esté dentro del marco de una investigación científica reconocida por la autoridad competente.

El Sr. Frank Alexis Vera Otárola o la entidad receptora del o los especímenes, declara expresamente conocer y aceptar íntegramente toda la normativa relativa al tratamiento de los especímenes entregados y se obliga a respetarla cabalmente.

Con fe de lo anterior, firman el presente documento

Sr. Director Regional
Servicio Agrícola y Ganadero

Sr. Frank Alexis Vera Otárola
Institución: Universidad San Sebastián

Fecha: 27-01-2025

9.11. Anexo 11. Permiso uso de muestras de ONG Chiloé Silvestre.

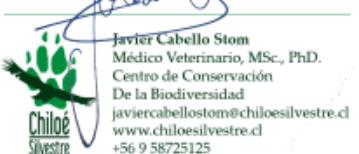
CERTIFICADO

Ancud, 20 de enero de 2025

El Centro de Conservación de la Biodiversidad Chiloé-Silvestre RUT 65.012.432-4 representado por el Dr. Javier Cabello Stom, RUT 13.407.897-9, certifica, en primera instancia, que:

- Posee un centro de rehabilitación de fauna silvestre inscrito en el Registro Nacional de Tenedores de fauna silvestre por resolución exenta N° 132/2017 del 1-02-2017 cuyo artículo segundo faculta a Chiloé-Silvestre a recibir especies de fauna silvestre protegida como gaviota dominicana (*Larus dominicanus*), pingüino magallánico (*Spheniscus magellanicus*) y pingüino de Humboldt (*Spheniscus humboldti*).
- A todos los animales que hacen ingreso por daños en su estado sanitario, se les realiza un examen clínico y tratamientos correspondientes a la afección que cursan, además de la toma de muestras biológicas para su diagnóstico y para investigación científica con instituciones asociadas (Universidad San Sebastián). Esto incluye la colecta de muestras formoladas, en el caso que algún animal fallezca o tenga que ser eutanasiado.
- Los protocolos para tomas de muestras de pudú, utilizadas en el presente estudio, denominado “CARACTERIZACIÓN HISTOPATOLÓGICA Y DETECCIÓN MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL DE VIRUS INFLUENZA AVIAR (H5N1), EN ÓRGANOS DE AVES MARINAS, INGRESADOS A LA UNIDAD DE MORFOLOGÍA Y DIAGNÓSTICO, ENTRE LOS AÑOS 2015 A 2025”, fueron aprobados por los equipos veterinarios de las instituciones involucradas.
- Todos los procedimientos estuvieron a cargo de Médicos Veterinarios titulares de cada institución y las muestras fueron colectadas como parte de los procedimientos de rutina de medicina preventiva en pacientes sanos y/o fallecidos, conservándose en bancos de muestras para colaborar con futuros estudios.

Se emite el presente certificado para los fines que el interesado estime convenientes



9.12. Extracto del convenio SAG-USS CEREFAS.

3.- Por otra parte, durante el transcurso de parte de los años 2023 y 2024 se ha registrado una epidemia de Influenza Aviar Altamente Patógena (IAAP) sin precedentes, donde diversos subtipos están causando brotes alrededor del mundo; entre estos se señalan los brotes notificados a la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA) por Canadá, Estados Unidos, Colombia, Venezuela, Ecuador y Perú.

4.- A partir de dicha experiencia, se hace necesario fortalecer la cooperación con los centros de rescate y/o rehabilitación con el fin de compartir acciones para el diagnóstico, considerando las posibilidades de encontrar reservorios de diversas enfermedades en la fauna silvestre.

9.13. Estadística órganos afectados y trastornos más frecuentes (inflamatorio y circulatorio).

	Contingency	A
1	Table Analyzed	Sugerentes IAAP
2		
3	P value and statistical significance	
4	Test	Fisher's exact test
5	P value	0.0255
6	P value summary	*
7	One- or two-sided	NA
8	Statistically significant ($P < 0.05$)?	Yes
9		
10	Data analyzed	
11	Number of rows	2
12	Number of columns	5

9.14. Estadística infiltrado inflamatorio linfocitario y mixto.

	Contingency	A
1	Table Analyzed	Infiltrado inflamatorio
2		
3	P value and statistical significance	
4	Test	Fisher's exact test
5	P value	0.2910
6	P value summary	ns
7	One- or two-sided	NA
8	Statistically significant ($P < 0.05$)?	No
9		
10	Data analyzed	
11	Number of rows	2
12	Number of columns	5

9.15. Estadística especies más afectadas (*Spheniscus sp.* Y *Larus dominicanus*) y trastorno inflamatorio.

	Contingency	A
1	Table Analyzed	Matriz inflamatorio
2		
3	P value and statistical significance	
4	Test	Fisher's exact test
5	P value	0.0981
6	P value summary	ns
7	One- or two-sided	NA
8	Statistically significant ($P < 0.05$)?	No
9		
10	Data analyzed	
11	Number of rows	2
12	Number of columns	5

9.16. Estadística órganos más afectados (pulmón e intestino) y trastorno inflamatorio.

	Contingency	A
1	Table Analyzed	Inflamatorio
2		
3	P value and statistical significance	
4	Test	Fisher's exact test
5	P value	0.3257
6	P value summary	ns
7	One- or two-sided	NA
8	Statistically significant ($P < 0.05$)?	No
9		
10	Data analyzed	
11	Number of rows	2
12	Number of columns	3

9.17. Estadística especies más afectadas (*Spheniscus sp.* Y *Larus dominicanus*) y trastorno necrótico.

	Contingency	A
1	Table Analyzed	Matriz necrosis
2		
3	P value and statistical significance	
4	Test	Fisher's exact test
5	P value	0.5916
6	P value summary	ns
7	One- or two-sided	NA
8	Statistically significant (P < 0.05)?	No
9		
10	Data analyzed	
11	Number of rows	2
12	Number of columns	5

9.18. Estadística órganos más afectados (riñón e hígado) y trastorno necrótico.

	Contingency	A
1	Table Analyzed	Necrosis
2		
3	P value and statistical significance	
4	Test	Fisher's exact test
5	P value	>0.9999
6	P value summary	ns
7	One- or two-sided	NA
8	Statistically significant ($P < 0.05$)?	No
9		
10	Data analyzed	
11	Number of rows	2
12	Number of columns	3

9.19. Estadística órganos más afectados (pulmón y riñón) y trastorno circulatorio.

	Contingency	A
1	Table Analyzed	Circulatorio
2		
3	P value and statistical significance	
4	Test	Fisher's exact test
5	P value	0.1213
6	P value summary	ns
7	One- or two-sided	NA
8	Statistically significant ($P < 0.05$)?	No
9		
10	Data analyzed	
11	Number of rows	2
12	Number of columns	3

9.20. Estadística órganos más afectados (hígado e intestino) y trastorno degenerativo.

	Contingency	A
1	Table Analyzed	Degenerativo
2		
3	P value and statistical significance	
4	Test	Fisher's exact test
5	P value	>0.9999
6	P value summary	ns
7	One- or two-sided	NA
8	Statistically significant ($P < 0.05$)?	No
9		
10	Data analyzed	
11	Number of rows	2
12	Number of columns	3

9.21. Estadística órganos más afectados (hígado e intestino) y trastorno del crecimiento.

	Contingency	A
1	Table Analyzed	Del crecimiento
2		
3	P value and statistical significance	
4	Test	Fisher's exact test
5	P value	0.1333
6	P value summary	ns
7	One- or two-sided	NA
8	Statistically significant ($P < 0.05$)?	No
9		
10	Data analyzed	
11	Number of rows	2
12	Number of columns	3