

**UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

Instituto de Zoología
Facultad de Ciencias

“PROSPECCIÓN DE ENFERMEDADES VIRALES, *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* Y *SALMONELLA SP.* EN CISNES DE CUELLO NEGRO (*Cygnus melanocorypha*, MOLINA. 1782) EN EL SANTUARIO DE LA NATURALEZA “RÍO CRUCES”, VALDIVIA.

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

**LUIS ALEJANDRO ALVARADO AGUILAR
VALDIVIA - CHILE
2004**

PROFESOR PATROCINANTE **Dr. Roberto Schlatter V.**
Nombre **Firma**

PROFESOR COPATROCINANTE **Dr. Jorge Ulloa H.**
Nombre **Firma**

PROFESORES CALIFICADORES. **Dr. Gonzalo Medina V.**
Nombre. **Firma**

Dr. Josef Köester G.
Nombre. **Firma**

FECHA DE APROBACIÓN **:** **8 de Enero del 2004**

A mis padres.

INDICE

	Página
1.- RESUMEN	1
2.- SUMMARY	2
3.- INTRODUCCION	3
4.- MATERIAL Y MÉTODOS	11
5.- RESULTADOS	15
6.- DISCUSIÓN	17
7.- BIBLIOGRAFÍA	23
8.- ANEXOS 1	28
9.- ANEXOS 2	32
10.- AGRADECIMIENTOS	39

1. RESUMEN.

Con el propósito de conocer el estado sanitario de una población de Cisnes de cuello negro silvestres (*Cygnus melanocorypha*) en el Santuario de la Naturaleza, se realizó una prospección de dos enfermedades: Enfermedad de Newcastle (ENC) e Influenza aviar (IA), y dos agentes infecciosos: *Mycoplasma gallisepticum* y *Salmonella sp.*

El análisis se realizó a partir de 52 muestras de suero de Cisnes de cuello negro capturados durante Mayo a Septiembre del 2003 en el Santuario de la Naturaleza Río Cruces, Valdivia, Chile. Determinando la ausencia o presencia de anticuerpos a ENC, IA y *Mycoplasma gallisepticum*. Para ello se utilizaron los siguientes métodos indirectos de laboratorio: Inhibición de la hemoaglutinación (antígeno virus vacuna cepa La Sota), inmunodifusión en gel agar, (antígeno y antisuero comercial para influenza aviar¹) y aglutinación rápida en placa, (antígeno comercial de *M. gallisepticum*²). También se determinó la presencia de *Salmonella sp* a partir de cultivo bacteriano de 17 muestras cloacales de la misma población de cisnes.

En los resultados no se detectaron anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación y en la aglutinación rápida en placa se evidenció ausencia de anticuerpos a *M. gallisepticum*. En el caso de la inmunodifusión en gel, de las 52 muestras analizadas, una reaccionó positivamente a virus influenza aviar (1,92%). En el examen bacteriológico de las muestras cloacales, no se detectó la presencia de *Salmonella sp.*

Debido a la presencia de anticuerpos a virus Influenza aviar se concluye, que se deben realizar muestreos a un mayor número de ejemplares de cisnes de cuello negro y otras aves acuáticas, para conocer con mayor exactitud la situación de esta enfermedad en el país. Con ello determinar, cual es la posibilidad de que aves acuáticas silvestres se vean afectadas por enfermedades de criaderos de aves o como las aves silvestres pueden diseminar el virus entre las de producción.

Los resultados negativos obtenidos para las otras enfermedades son preliminares y representan una aproximación de la situación sanitaria de los cisnes muestreados en esta investigación. Se debe considerar además, que el comportamiento nómada de estas aves las hace extremadamente susceptibles a una mayor exposición a agentes infecciosos, tanto en Chile como en los demás países donde se dispersan.

Palabras claves: Cisnes de cuello negro, *Cygnus melanocorypha*, Enfermedad de Newcastle, Influenza aviar, *Mycoplasma gallisepticum*, *Salmonella sp.*

¹ National Veterinary Serve Laboratory (NVSL).

² NOBILIS®, Laboratorio INTERVET.

2. SUMMARY

Whit the purpose of getting to know the sanitary status of population wild black-necked swans (*Cygnus melancorypha*). The prospection of two diseases was done: Newcastle disease (ND) and Avian Influenza (AI); and two infectious agents: *Mycoplasma gallisepticum* and *Salmonella sp.*

Fifty-two simples of serum, from Black-necked swans, captured between June and September 2003 in the Río Cruces Wetland Sanctuary, Valdivia, Chile. Were used in this analysis for determining presence or absence of antibodies for Newcastle disease, Avian Influenza (IA) and *Mycoplasma gallisepticum*. Indirect laboratory methods were used for this: Inhibition of haemoagglutination (vaccine virus antigen, cape La Sota) Agar gel Immunodifusión (Antigen and antiserum for AI³) and rapid agglutination on plates, (commercial antigen of *M. gallisepticum*⁴). The presence of *Salmonella sp* was also determine with the use of bacteriological culture of 17 cloacal samples, taken from the same swan population.

No haemoagglutination inhibitor antibodies were detected with the rapid plate agglutination method for *M. gallisepticum* infectious agent. In the case of immunodifusion en gel, ne positive reaction (1,92%), to Avian Influenza Virus was observed out of 52 analysed samples. By using bacteriological culture the presence of *Salmonella sp*, was negative in swan cloacal samples.

Due to presence of Avian Influenza Virus antibodies it can be concluded that further sampling should be done over a greater number of Black-necked swans and other acuatic bird. With this we could know with more presition the situation of this particular disease in our country; and determinate the possibility that wild acuatic birds are affected by poultry disease, or that wild birds can be disseminators of poultry viruses.

The negative results obtained for the other diseases are preliminary and represent only an approximation of the sanitary state of the swans sampled during this investigation. It also has to be considered that the nomadic behaviour of this birds makes them extremely susceptible to a greater exposure to infectious agents, in Chile as well as in the countries where they disperse.

Key Words: Black-necked swans, *Cygnus melancorypha*, Newcastle disease (ND), Avian Influenza (AI), *Mycoplasma gallisepticum*, *Salmonella sp.*

³ National Veterynari Serve Laboratory (NVSL).

⁴ NOBILIS®, Intervet Laboratory.

3. INTRODUCCIÓN.

3.1 GENERALIDADES.

La relevancia que ha adquirido la fauna silvestre en la Medicina Veterinaria y la importancia que las aves silvestres tienen como posibles diseminadoras de enfermedades en aves de producción, nos ha inducido a realizar el presente trabajo que pretende dar un acercamiento a la situación de cuatro de ellas: Influenza aviar (IA), Enfermedad de Newcastle (ENC), *Salmonella sp* y *M. gallisepticum*. Estas epizootias fueron prospectadas en 52 Cisnes de cuello negro (*Cygnus melanocorypha*), capturados en el Santuario de la Naturaleza “Río Cruces”.

El Cisne de cuello negro (*Cygnus melanocorypha*), es una de las aves emblemáticas y características en el Santuario, pues es en esta área donde se reúne probablemente la población reproductiva más importante del Cono Sur (CONAF, 1999), con concentraciones que han superado en años del Niño (ENOS) a los 14.000 ejemplares (Schlatter y col., 2002).

La Corporación Nacional Forestal (CONAF) desde 1972 lleva a cabo proyectos de investigación y manejo de especies con problemas de conservación, tendientes a conocer sus costumbres, recuperar poblaciones y, dependiendo de las condiciones, permitir en el futuro su uso racional. De acuerdo al Simposio llevado a cabo por CONAF durante 1987 en Santiago, la región de Los Lagos posee cinco especies de aves en peligro de extinción, doce raras, nueve vulnerables, nueve inadecuadamente conocidas y dos fuera de peligro (CONAF, 1999).

Según la Oficina Internacional de Epizootias (OIE, 2002a), la Influenza aviar y la enfermedad de Newcastle son enfermedades que presentan gran poder de difusión y especial gravedad, ya que pueden extenderse más allá de las fronteras nacionales, con ello traer consecuencias socioeconómicas o sanitarias graves cuya incidencia en el comercio internacional de animales y productos de origen animal es muy importante, por esta razón están consideradas como enfermedades de la lista A.

Según la OIE (2002b), en todos estos países la influenza aviar altamente patógena nunca ha sido comprobada, en tanto que el último registro de ENC fue en Junio del 2001 en Brasil.

3.2 EL CISNE DE CUELLO NEGRO.



FOTO 1: Cisnes de cuello negro en el Santuario de la Naturaleza “Río Cruces”.

3.2.1. Taxonomía.

CUADRO 1. Categoría y Taxa del Cisne de Cuello Negro (*Cygnus melanocorypha*, Molina, 1782), (Scott y col., 1972).

Clase	Aves.
Subclase	Neornithes.
Superorden	Neognathae.
Orden	Anseriformes.
Suborden	Anseres.
Superfamilia	Anatoidea
Familia	Anatidae.
Subfamilia	Anserinae.
Genero	Cygnus.
Especie	melanocorypha

3.2.2 Biología.

El Cisne de cuello negro (*Cygnus melanocorypha*, Molina 1782) es un ave de gran tamaño que mide entre 110 - 125 cm de longitud total. Su cuerpo es blanco con el cuello y cabeza negros. El pico es negrusco con una carúncula roja en la base. Las crías son blanquecinas y luego grises, con cuello parduzco en estado juvenil. Nidifica en bordes de humedales con abundante vegetación donde construye un nido grande con restos vegetales, colocando entre 4 y 6 huevos. Su distribución abarca el sur de Brasil, Uruguay, Argentina, Chile y ocasionalmente Paraguay. En Chile se encuentra desde la III a la XII Región, en zonas con abundantes vegetales acuáticos como ríos, lagunas, y estuarios (Schlatter, 1998).

El periodo reproductivo se extiende entre los meses de Julio y Febrero, y la muda es entre los meses de Noviembre y Mayo (Schlatter y col., 1991).

La alimentación de los cisnes ubicados en el sector en estudio consiste principalmente en Luchecillo (*Egeria densa*) (Corti, 1996).

Durante el censo realizado por CONAF el año 1999, el número de Cisnes de cuello negro contabilizados durante el mes de Enero en el Santuario de la Naturaleza, fue de 3792 ejemplares (CONAF, 2000).

La falta de alimento y/o las variaciones climáticas relacionada a años con temporadas estivales de baja pluviometría desatarían un comportamiento nómada que los llevaría a recorrer otros países o arribar desde otras partes (Schlatter y col., 2002).

El fenómeno del Niño (El Niño Oscilaciones del sur: ENOS) a sido documentado a lo largo de la costa sudamericana con efectos sobre roedores, aves terrestres, pingüinos y otras aves marinas. El número local de Cisnes de cuello negro fluctúa fuertemente en algunos años y al parecer se trataría de movimientos erráticos (nomadismo). Los cisnes se mueven desde el sur de Brasil pasando por Uruguay y el Sur de Argentina y Chile. Ha sido propuesta una relación entre los movimientos de los cisnes y el fenómeno del Niño. El número de cisnes ha aumentado en los últimos 25 años, pero este número tiene fluctuaciones entre estaciones del año y entre años por lo que el fenómeno del Niño puede incidir con estas fluctuaciones (Schlatter y col., 2002).

3.3 ESTADO DE CONSERVACION.

Debido a las fluctuaciones en el número de Cisne de cuello negro, éste esta catalogado según el libro rojo de los vertebrados de Chile, como Vulnerable para el país y actualmente propuesto, como fuera de peligro para la Décima región. La condición de vulnerable significa que se trata de una taxa la cual se cree pasara en el futuro a la categoría en peligro de extinción si los factores causales de la amenaza continúan operando (CONAF, 1988).

3.4 SANTUARIO DE LA NATURALEZA E INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA “CARLOS ANWANDTER”.

Gran importancia en el desarrollo de esta especie y como sector de alimentación y nidificación ha adquirido el Santuario de la Naturaleza e Investigación Científica “Carlos Anwandter”.

En 1981 el Santuario de la Naturaleza “Carlos Anwandter” (parte de la propuesta Reserva Nacional del Río Cruces) fue incorporada en la lista de Zonas Húmedas de Importancia Internacional por la Convención RAMSAR (Convención relativa a Humedales de Importancia Internacional Especialmente como Hábitat de aves acuáticas) (CONAF, 1999).

En este Santuario de la Naturaleza destaca la presencia del Cisne de cuello negro (*Cygnus melanocorypha*), especie que tiene actualmente en esta área una importante población, no obstante que sólo se reproduce el 16% de ella (Schlatter, 1998).

Junto a los Cisnes se encuentran también en este hábitat aves como el: Pato anteojo (*Anas specularis*), Pato jergón chico (*Anas flavirostris*), Pato jergón grande (*Anas georgica*), Pato real (*Anas sibilatrix*), Pato colorado (*Anas cyanoptera*), Pato negro (*Netta peposaca*), todos pertenecientes al Orden Anseriformes, además de Taguas las cuales pertenecen al Orden Gruiformes (CONAF, 1999). Ocasionalmente se observan gansos y patos domésticos así como Anseriformes exóticos de un criadero existentes en el Fundo “Corcovado”.⁵

3.5 SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO.

Es de interés para el Estado de Chile tener conocimiento respecto a la situación de salud de sus animales no sólo domésticos sino también silvestres, debido a la posibilidad de diseminación de enfermedades desde un grupo a otro. Existe principal interés sobre la Influenza aviar, la cual provocó un impacto económico de US\$ 22 millones a la industria avícola chilena atacando a tres importantes plantas de crianza y procesamiento a comienzos de Junio del 2002, cerrando mercados y exportaciones para la producción nacional (Minagri, 2002).

A principios de Mayo del 2002, los reproductores de parrilleros en Chile central experimentaron baja mortalidad, leve disminución en la producción de huevos y peritonitis de huevos causada por un virus de la Influenza aviar subtipificado como AIV H7N3. En parvadas posteriores la mortalidad aumentó a cerca del 100%, debido a que el virus se había transformado en un virus de alta patogenicidad (HPAIV). Gracias a un programa de acción radical se logró erradicar el HPAIV (Swayne y Suarez, 2003). Ante estas emergencias el Servicio Agrícola y Ganadero dispone:

⁵ Comunicación personal Dr R. Schlatter. Director Instituto Zoología, Universidad Austral de Chile.

Mantener un sistema de vigilancia y diagnóstico de las enfermedades silvoagropecuarias existentes en el país o susceptibles de presentarse que, a juicio del servicio, sean relevantes para la producción nacional y formular los programas de acción que correspondan. Ejecutar directa e indirectamente, en forma subsidiaria, las acciones destinadas a cumplir las medidas tales como, prevención, control, combate y erradicación de las enfermedades o plagas declaradas de control obligatorio, tratándose, a juicio del Servicio, de plagas o enfermedades que por su peligrosidad o magnitud, pueden incidir en forma importante en la producción silvoagropecuaria nacional (SAG, 1994).

Durante el año 2001 se realizó un monitoreo de enfermedades aviares tanto en planteles industriales como en planteles caseros y comercializadores de aves mascotas. La totalidad de los exámenes, 39.000 para Influenza aviar y 2.291 para ENC, resultaron negativos. El alto número de exámenes para influenza aviar, corresponde al resultado de exigencias sanitarias para exportación (OIE, 2002c).

3.6 ENFERMEDADES PROSPECTADAS.

3.6.1 Enfermedad de Newcastle.

El virus más importante de la familia *Paramixoviridae* es el de la Enfermedad de Newcastle (ENC). Este virus (Paramixovirus tipo 1 o PMV- 1) es comúnmente asociado a Enfermedad de Newcastle y se relaciona a un amplio número de especies de aves, pero principalmente a las aves domésticas, además de los humanos, sin embargo, existen otros serotipos de este virus que son más restrictivos en cuanto al rango de especies de aves que afecta (Ritchie, 1995).

El virus pertenece al Orden *Mononegavirales*, Familia *Paramixoviridae*, Subfamilia *Paramixovirinae* y Genero *Rubulavirus*, corresponde a un virus RNA con envoltura, pleomórfico, nucleocápside con forma de hueso espigado (Alexander, 2000).

Según Ritchie (1995) los serotipos que afectarían a las aves acuáticas como gansos y patos no provocan cuadros sintomáticos en estas aves. En tanto que PMV- 1 provoca signos que varían según la especie, edad, condición del hospedador y virulencia del virus. Los signos clínicos pueden variar desde una forma respiratoria a digestiva o nerviosa.

Existen muchas cepas de este virus, una de ellas afecta al cormorán (*Phalacrocorax* sp). Esta es similar a la variedad que ha producido grandes epidemias en las gallinas en todo el mundo y a pesar de que se han aislado cepas avirulentas de esta ave acuática, se considera que en ocasiones puede transmitir la infección a aves domésticas (Zamora, 1998).

La transmisión del virus de la ENC es a través de secreciones, primariamente respiratoria y además por fecas (Ritchie, 1995).

Blaxland (1951) hace referencia a reportes de la existencia de la enfermedad de Newcastle en cisnes al Este de Alemania. Además consideró la posibilidad de que la diseminación de esta enfermedad en aves domésticas en Escocia este relacionada a las aves acuáticas silvestres.

En un brote ocurrido en cormoranes y pelícanos en Canadá y el norte de Estados Unidos durante 1990 y 1992, se detectó virus Newcastle indistinguible del que se recuperó de pavos que mostraban signos de Newcastle velogénico neurotrópico (Alexander, 2000) en las cercanías de los cormoranes enfermos. Investigaciones más recientes hechas en Francia por Artois y col. (2002) en cormorán grande (*Phalacrocorax carbo*), demostraron presencia de virus Newcastle en 10 de 53 ejemplares.

Cabe destacar la presencia de poblaciones de cormorán yeco (*Phalacrocorax brasilianus*) en los sectores aledaños a los sitios de muestreo, los que pueden actuar como potenciales diseminadores de virus Newcastle si es que estos estuvieran infectados. Existe una colonia de más de 2000 ejemplares reproductivos en el Santuario, activos entre Octubre y Marzo de cada año (Jiménez, 2001).

3.6.2 Influenza aviar.

Las aves silvestres especialmente las acuáticas, son consideradas fuentes de infección para la industria de las empresas avícolas en todo el mundo (U. S. Geological Survey, 1999).

La familia *Orthomyxoviridae* contiene los virus de la Influenza divididos en 3 tipos A, B y C. Se trata de un virión pleomórfico de unos 60 a 120 nm de diámetro. El virus de la Influenza tipo A es el más importante afectando gran cantidad de mamíferos, aves y también a los humanos (Ritchie, 1995).

Los virus pertenecientes al grupo A se subclasifican de acuerdo a la estructura de 2 antígenos de la cubierta exterior, la Hemoaglutinina (HA) y la Neuroaminidasa (NA), así es como se reconocen 14 diferentes HA y 9 NA, de las cuales resultan 126 combinaciones antigénicas diferentes de virus Influenza (Estudillo, 1998). Además se debe tomar en cuenta, que las aves constituyen una posible fuente de recombinación del virus de la Influenza por su gran riqueza en genes de subtipos, es por eso, que en los últimos años se han realizado investigaciones en aves domésticas y silvestres, en diversas partes del mundo, de las cuales se ha aislado una gran cantidad de cepas (Acha y Szyfres, 1986).

El virus de la Influenza aviar ha sido encontrado en muchas especies de aves, pero en donde es más frecuente es en las aves acuáticas migratorias (U. S. Geological Survey, 1999). Sin embargo, estas aves permanecen asintomáticas cuando se infectan con el virus de la Influenza aviar. La transmisión del agente se hace por medio de gotitas o aerosoles respiratorios o por la materia fecal (Ritchie, 1995).

Muchas especies de aves son consideradas como susceptibles. Los signos clínicos dependen de la especie afectada, edad, sexo, infecciones concomitantes, cepas del virus, factores ambientales, además del virus infectante. La signología que se presenta con mayor frecuencia es de tipo respiratoria, por ejemplo: tos, estertores, estornudos, lagrimeo excesivo, sinusitis, edema de la cabeza, además de trastornos nervioso y digestivos (Easterday y col., 2000)

3.6.3 *Mycoplasma gallisepticum*.

La Micoplasmosis aviar por *M. gallisepticum* y *M. sinoviae* sigue siendo en la actualidad una de las principales enfermedades involucradas en pérdidas de producción en la avicultura mundial. Entre los factores adversos para que los brotes sucedan en los planteles está la posibilidad de que la bacteria se encuentre en las aves silvestres (Cerde, 2003).

M. gallisepticum es una especie patógena dentro del género *Mycoplasma* de la familia *Micoplasmataceae*. El microorganismo es un Gram negativo débil que se tiñe bien con Giemsa, por lo general es cocoide, y mide entre 0,25 a 0,5 μm (Kleven, 2000).

Esta bacteria puede causar enfermedad aguda o crónica. El *M. gallisepticum* se asocia a patógenos facultativos que necesitan de condiciones especiales para generar cuadros sépticos. Estas condiciones pueden ser factores que debiliten la resistencia natural del ave.

Sólo el *M. gallisepticum* es conocido de importancia en las aves silvestres. Este ha sido aislado desde gansos, patos y cisnes. La vía de transmisión es por aerosol y además se podría diseminar a través de equipo contaminado. Cabe destacar que *Mycoplasma anatis* ha sido aislado desde patos, taguas y halcones, lo cual indica la posibilidad de infección interespecie (U. S. Geological Survey, 1999).

La signología más común es, secreción nasal mucopurulenta, renuncia a volar, vuelo torpe, inflamación de la parte posterior de la faringe, ruidos respiratorios especialmente perceptibles por la noche e inflamación de los sacos aéreos (U. S. Geological Survey, 1999).

3.6.4 *Salmonella sp.*

La Salmonelosis aviar es causada por un grupo de bacterias del género *Salmonella*. De las cuales aproximadamente 2300 tipos han sido identificados. Las aves silvestres son más comúnmente afectadas por *S. typhimurium* y *S. enteritidis* provocando una alteración llamada infección Paratifoidea. La transmisión de esta enfermedad en aves silvestres es principalmente a través de la contaminación del alimento y agua por descargas fecales o por contacto directo entre las aves (U. S. Geological Survey, 1999).

Las *Salmonellas* son bacterias en forma de bastón recto, gram negativas que no esporulan, y que miden entre 0,7 a 1.5 por 2.0 a 5.0 μm . Las *Salmonellas* por lo general son peritricosos, flagelados y móviles, aunque en ocasiones se presentan en forma natural como mutantes no móviles. Las colonias típicas de *Salmonella sp* en medios de agar son de 2 a 4 mm de diámetro, de borde redondeado y lisos, ligeramente levantados y brillantes. (Gast, 2000).

La infección paratifoidea se relaciona por lo general, con enfermedad sólo en aves muy jóvenes. La contaminación en los huevos con *Salmonella* puede ocasionar una gran cantidad de embriones muertos (Gast, 2000).

Los signos observados son similares a los de la Pullorosis (*Salmonella pullorum*) y tifoidea aviar (*Salmonella gallinarum*), las aves jóvenes son las más comúnmente afectadas, los signos y lesiones son idénticos a los de una septicemia aguda que puede ser causada por una amplia variedad de bacterias incluida *E. coli* (Gast, 2000).

La infección por *Salmonella* se ha detectado en muchas especies de aves silvestres. En años recientes se han publicado múltiples informes de gaviotas infectadas en sistemas de alcantarillados de granjas y en tubos de descargas de ciudades. Las aves infectadas pueden esparcir los microorganismos a las granjas y praderas donde hay animales domésticos que también pueden ser infectados (Wray y Davies, 2000).

Las *Salmonellas* son una de las principales causas de enfermedad por alimentos contaminados en todo el mundo, más de un tercio de los brotes de salmonelosis por contaminación de alimentos en humanos se ha relacionado con carne o huevos de aves (Gast, 2000).

Según los antecedentes recolectados y la necesidad de conocer al Cisne de cuello negro en cuanto a su condición sanitaria y posible rol en la diseminación de enfermedades de importancia económica, se estima importante realizar un estudio prospectivo preliminar para aportar información acerca de su situación sanitaria, en el Santuario de la Naturaleza e Investigación Científica “Carlos Anwandter” del río Cruces, Valdivia.

De acuerdo a los antecedentes recopilados, con respecto a la presencia de estas patologías en aves silvestres, la hipótesis de este estudio es que, las enfermedades aquí prospectadas (Enfermedad de Newcastle, Influenza aviar, *Mycoplasma gallisepticum*, *Salmonella sp*), están presentes en los Cisnes de cuello negro muestreados desde la población del Santuario de la Naturaleza.

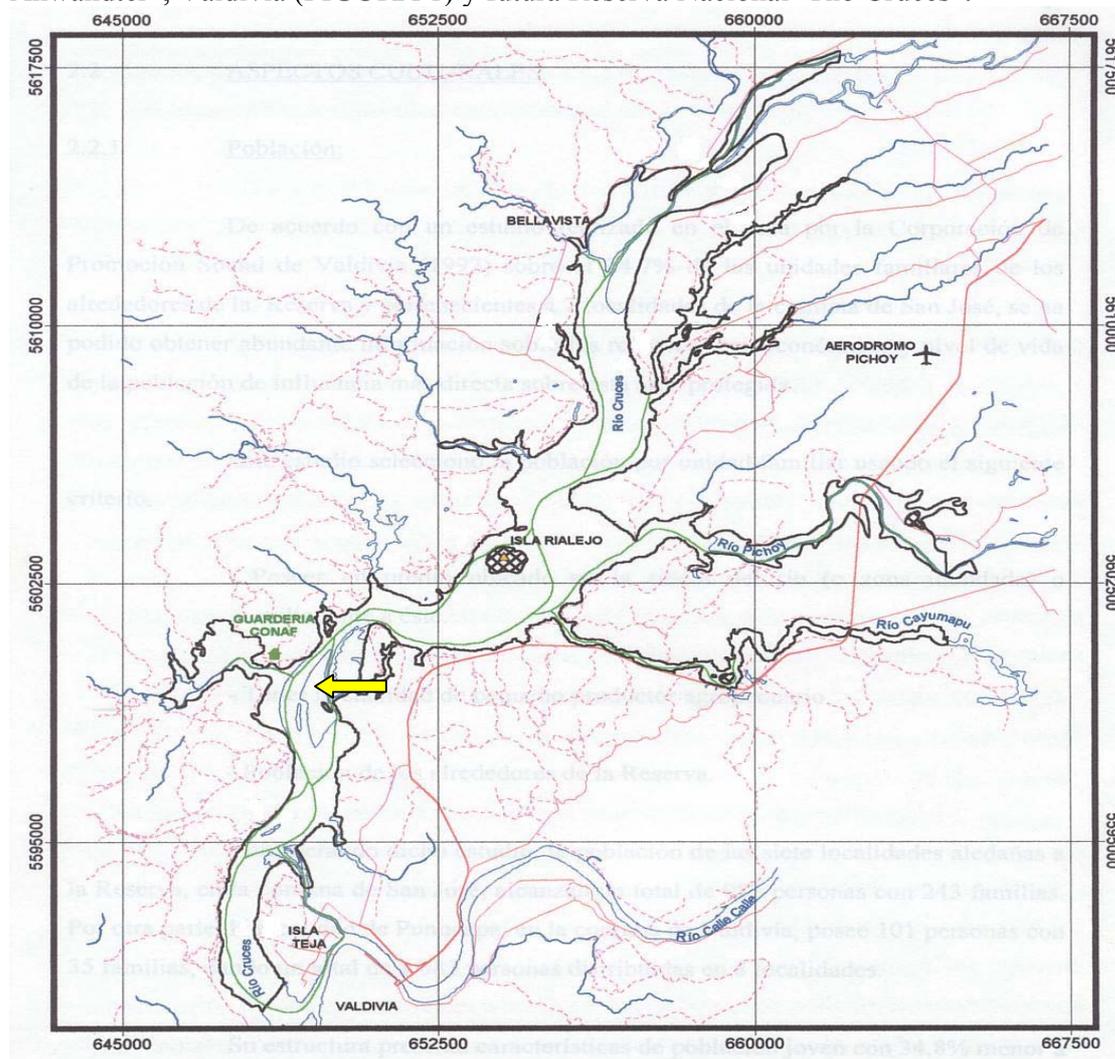
Los objetivos de esta investigación, fueron:

- Obtener 52 muestras de sangre con la metodología adecuada y realizar el análisis de laboratorio para el diagnóstico de enfermedades (virales y bacterianas) comunes e importantes.
- Estudiar el estado sanitario externo de 52 cisnes de cuello negro (*Cygnus melanocorypha*), ubicados en el Santuario de la Naturaleza.

4. MATERIAL Y METODOS.

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO Y CAPTURA DE EJEMPLARES.

Se capturaron 52 individuos Cisne de cuello negro (*Cygnus melanocorypha*), adultos e inmaduros, machos y hembras en los días 7, 21 de Junio y 3 de Septiembre del 2003, en el sector de San Ramón, Santuario de la Naturaleza e Investigación Científica “Carlos Anwandter”, Valdivia (FIGURA 1) y futura Reserva Nacional “Río Cruces”.



← : Lugar de captura de los Cisnes de cuello negro

Escala: 1: 150.000

FIGURA 1: Mapa del área de muestreo, sector San Ramón.

El achurado verde indica el Santuario de la Naturaleza “Carlos Anwandter” (4877 há).

Para la captura de los cisnes se solicitó permiso al Servicio Agrícola y Ganadero, SAG (ANEXO 2) y Corporación Nacional Forestal, CONAF (ANEXO 2), en la ciudad de Valdivia. Para el acercamiento a los cisnes se utilizó un bote a motor perteneciente a CONAF, y con la ayuda de los guardafaunas que trabajan en dicho sector fueron capturados mediante el uso de un chinguillo adaptado (FOTO 2). Una vez en el bote, las aves se guardaron en sacos para evitar que se escapen y estresen, luego se llevaron a tierra a un improvisado sitio de CONAF con facilidades mínimas de laboratorio en terreno para la toma de muestras y examen clínico a los cisnes capturados.



FOTO 2: Material de captura cisnes de cuello negro. Guarda fauna Don Luis Miranda en sector del Santuario de la Naturaleza.

4.2 TOMA DE MUESTRA DE SANGRE, PESAJE Y MEDICIÓN.

Para la muestra de sangre, se utilizó, jeringas de 3 ó 5 ml, agujas de 1,5 pulgadas y 21G, alcohol, Polividona yodada, tubos de ensayo, toalla de papel y bolsa de agua caliente. Los tubos de ensayo se depositaron en gradillas que posteriormente se mantuvieron en neveras portátiles con unidades refrigerantes. Después de la toma de muestra se pesaron, medieron y se marcaron con ácido pícrico los cisnes revisados para evitar la recaptura.

Se extrajo 10 ml de sangre por cada Cisne de la vena Metatarsal Media (FOTO 3). Las patas de las aves fueron agitadas y precalentadas con bolsa de agua caliente para activar la circulación y asegurar el flujo y goteo sanguíneo necesario para completar los 10 ml. Las muestras se dejaban coagular aproximadamente 10 minutos para separar el suero del coágulo, y después ser analizadas en el laboratorio. Los cisnes se midieron, pesaron y sexaron, registrando los datos en la ficha de notas (ANEXO 1). Durante la 3ra salida a terreno (3 de Septiembre) se realizó la toma de muestra cloacal con tórula estéril a los 17 cisnes capturados en esa ocasión.



FOTO 3: Punción Vena metatarsal media y extracción de sangre.

4.3 PRUEBA DE INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN (IHA).

La prospección de los anticuerpos de virus Enfermedad de Newcastle se realizó mediante la prueba de Inhibición de la Hemoaglutinación, utilizando como antígeno el virus vacuna, cepa La Sota.

Los materiales para esta prueba son: placa con 96 pocillos con fondo redondo, sueros problemas, antígeno, suspensión de glóbulos rojos 1% para HA y al 1% para IHA, solución fisiológica tamponada (PBS), micropipeta, puntas amarillas y dilutores de 25 μ l y 50 μ l.

Para la prueba IHA se realizó un microtítulo, utilizando 4 unidades hemoaglutinantes y una suspensión de glóbulos rojos al 1%, según lo descrito por Alexander (1998).

4.4 PRUEBA DE INMUNODIFUSION EN GEL AGAR (IDGA) .

La prospección de virus Influenza aviar en Cisnes de cuello negro se realizó en el Laboratorio y Estación de Cuarentena Complejo Lo Aguirre del Servicio Agrícola y Ganadero, Santiago. La prueba diagnóstica que se utilizó fue la Inmunodifusión en gel agar.

Para esta prueba se utilizó agar agarosa, antígeno virus Influenza aviar tipo A, suero problema, antisuero y pipetas.

En la prueba se confrontaron los antígenos precipitantes del virus de la Influenza aviar con el antisuero y los sueros problemas según la técnica descrita por Swayne y col. (1998).

4.5 PRUEBA DE AGLUTINACIÓN RÁPIDA EN PLACA.

Con respecto a la prospección de los anticuerpos a *M. gallisepticum* en los Cisnes de cuello negro del Santuario del río Cruces, se realizó la prueba de aglutinación rápida en placa, utilizando para este método un antígeno comercial de *M. gallisepticum*.

En esta prueba se confrontaron sueros problemas con antígenos aglutinantes de acuerdo al procedimiento descrito por Kleven (1998).

4.6 CULTIVO BACTERIANO.

Los materiales utilizados fueron, tómulas estériles, medio de cultivo caldo Peptona, Rapaport, Selenito Cistina y agar XLD.

Para el cultivo e identificación de los gérmenes se usó como orientación el Manual de Sistemática Bacteriológica Bergey (Bergey, 1984).

5. RESULTADOS

El análisis de laboratorio de las muestras de suero de los 52 Cisnes de cuello negro, dio como resultado:

- a) Ausencia de anticuerpos al virus de la Enfermedad de Newcastle.
- b) Ausencia de anticuerpos a la bacteria *Mycoplasma gallisepticum*.
- c) Ausencia de colonias de *Salmonella sp.* en cultivo bacteriano.
- d) Presencia de anticuerpos a virus de la Influenza Aviar tipo A.

A continuación se presenta en detalle los resultados obtenidos para cada una de las enfermedades prospectadas

5.1 ENFERMEDAD DE NEWCASTLE (ENC).

Mediante la prueba IHA. para el diagnóstico de Enfermedad de Newcastle, los resultados obtenidos en las 52 muestras analizadas fueron todos negativos.

5.2 INFLUENZA AVIAR (IA).

Del total de sueros muestreados (52), hubo presencia de anticuerpos al virus de la Influenza aviar tipo A en una muestra (CUADRO 2).

CUADRO 2: Distribución porcentual de sueros reaccionantes a la prueba de Inmunodifusión en agar gel.

Prueba IDGA		
Sueros	n° muestras	%
Reaccionantes	1	1,92
No reaccionantes	51	98,08
Total	52	100

Se observa, que de los 52 sueros de Cisnes de cuello negro muestreados, solo en uno de hubo reacción frente al antígeno, lo que representa el 1,92% del total. Cabe destacar que la prueba se repitió para el suero reaccionante resultando positivo nuevamente.

5.3 MYCOPLASMA GALLISEPTICUM .

Utilizando la aglutinación rápida en placa con un antígeno comercial de *Mycoplasma gallisepticum*, todas las muestras analizadas resultaron negativas.

5.4 SALMONELLA SP.

El resultado de los cultivos bacterianos dio negativo a la presencia de *Salmonella sp.* en todas las muestras examinadas.

6. DISCUSIÓN.

Debido a la escasa literatura sobre el estado sanitario, tanto de los Cisnes de cuello negro, como de las demás aves acuáticas en Chile, se realizaron comparaciones respecto a aves de otros países y a su posible función como reservorio de enfermedades.

Debido a las bajas temperaturas del agua y ambiente durante los días de captura y la consecuente vasoconstricción periférica de las aves para mantener la sangre en la cavidad celómica, se tuvo que utilizar bolsa de agua caliente para lograr bajar la sangre a las extremidades y así obtener la muestra.

6.1 ENFERMEDADES VIRALES.

6.1.1 Enfermedad de Newcastle.

A continuación, se analiza el uso de la prueba inhibición de la hemoaglutinación (IHA), como prueba diagnóstica para la enfermedad de Newcastle (ENC) y los resultados obtenidos tras el análisis de las muestras.

Tanto el virus de la ENC (PMV-1), como otros paramixovirus aviares han sido detectados y cuantificados por dicha prueba (Alexander, 1998), debido a la capacidad de este virus y de otros paramixovirus de aglutinar eritrocitos, por la fijación de la proteína hemaglutinina-neuraminidasa a los receptores sobre su superficie. Esta propiedad y la inhibición específica de aglutinación por antisueros, son instrumentos muy útiles en el diagnóstico de la enfermedad (Alexander, 2000). Cabe destacar que la cantidad mínima de proteínas de anticuerpos que puede detectar esta prueba es de 0,005 µg/ml (Tizard, 1996).

Si bien es cierto que las aves acuáticas son las más resistentes a la ENC (Ritchie, 1995; Alexander, 2000), estas son uno de los principales reservorios conocidos, manteniendo cepas avirulentas en el medio ambiente (Zamora, 1998). Esto coincide con lo dicho por Wilson (1950); Blaxland (1951) al identificar a las aves acuáticas como las más susceptibles a la infección por virus Newcastle.

Así es como, Stanislawek y col. (2002) en Nueva Zelanda, mediante IHA detectó Paramixovirus-1,-2,-3,-4,-6,-7,-8,-9 en Pato de collar (*Anas platyrhynchos*), donde el 93.1% correspondió a virus de la enfermedad de Newcastle (PMV-1).

Sin embargo, Uhart y col. (2003), en la Patagonia Argentina, al buscar ENC en petrel gigante antártico (*Macronectes giganteus*), en 25 ejemplares, obtuvo sólo resultados negativos. A igual que en Irlanda, Graham y col. (1999), en su intento por aislar el virus de ENC (PMV-1) desde ganso silvestre (*Branta bernicla*).

Esta situación coincide con lo ocurrido en el presente estudio y podemos decir que los cisnes muestreados no han estado en contacto con el virus de la ENC.

6.1.2 Influenza aviar.

Algo distinto a lo ocurrido con la prospección de ENC, fue lo que paso con el virus de la Influenza Aviar (VIA), enfermedad viral que provoca pérdidas millonarias en los planteles avícolas en Chile y el mundo.

La prospección del VIA, se realizó mediante Inmunodifusión en gel agar (IDGA), la cual se basa según Easterday y col. (2000), en la detección de anticuerpos contra la nucleoproteína del virus. Este autor señala que esta prueba es una de las más comunes en la búsqueda de anticuerpos a VIA. La prueba utilizada presenta una alta especificidad y baja sensibilidad, lo que disminuye la posibilidad de reacciones falsas positivas al momento del diagnóstico. No obstante, en aves acuáticas el virus de la Influenza aviar produce normalmente una infección local de las tonsilas cecales lo que significa que el agente no tiene un contacto antigénico intenso con el sistema inmune del huésped. Así la formación de anticuerpos es escasa o nula, dificultando su detección mediante IDGA. Es por eso, se recomienda el frotis de tonsilas cecales o tórulas cloacales profundas e inoculación de huevos embrionados, para la obtención del virus que es el resultado más fidedigno⁶. En el caso de presentarse el VIA, lo que sigue es realizar la subtipificación del virus⁷.

Con respecto a la línea de precipitación continua formada entre el suero hiperinmune control y el suero positivo, esta demuestra la presencia de componentes comunes entre los sueros, y es descrita como reacción de identidad, siendo la capacidad mínima de IDGA para detectar proteínas de anticuerpos de 30 ug/ ml (Tizard, 1996).

Esta reacción indica que de los cisnes muestreados (52), al menos uno estuvo en contacto con el virus y que su contagio debió haberse producido durante el año en curso, ya que, según García y Méndez (1996), la prueba IDGA puede detectar anticuerpos desde los 7 – 10 días post infección, y estos dependiendo del virus, no se mantienen por más de un año en el animal⁸.

La presencia de anticuerpos no significa haber contraído la enfermedad, más bien indica la necesidad de realizar una prospección más intensa y, con mejor tecnología y sofisticación.

Debido a la alta especificidad de la prueba se puede tener seguridad en que la respuesta observada es debido a VIA.

El encontrar un cisne con anticuerpos a VIA, podría indicar que el virus esta presente en el sitio de muestreo y que su diseminación podría ser mediante contacto directo entre las aves acuáticas presentes en el santuario, como también de forma indirecta, con aves infectadas

⁶ Comunicación personal Dr. Josef Köster.

⁷ Comunicación personal Dr. Christian Matthieu B. Director Laboratorio de Virología Servicio Agrícola y Ganadero (Santiago)

⁸ Comunicación personal Dr. Jorge Ulloa H. Profesor Instituto Patología aviar, Universidad Austral de Chile.

que pueden excretar concentraciones elevadas de virus, a través de sus heces, contaminando así las aguas y otros elementos (Easterday y col., 2000).

En Baltimore, Graves (1992) en un estudio en Cisne vulgar (*Cygnus olor*) n = 262, utilizando la prueba IHA, diagnosticó influenza aviar en un 79% de adultos y en un 3% de juveniles (3 a 4 meses de edad). En ese estudio se capturaron cantidades similares de hembras y machos. Según Graves (1992) no había diferencia significativa en los resultados obtenidos entre sexos, pero si existían diferencias entre las edades de las aves muestreadas.

Previamente Slemons y col., (1974) detectaron este virus en patos silvestres en California.

Durante el otoño e invierno de 1998, después de un brote ocurrido en un plantel de avestruces, se muestrearon 262 aves acuáticas de 14 especies diferentes, de 8 muestras se pudo aislar el subtipo H10 y de una el H6, éste resultó ser el mismo que se aisló de las avestruces durante el brote mencionado (Pfizer y col., 2000).

Es por esta razón que García y Méndez (1996), al identificar en aves infectadas con virus influenza, de los subtipos H5 y H7, sugieren la aplicación inmediata de medidas de control para evitar la diseminación de estos virus, en virtud de la inestabilidad de sus hemoaglutininas.

La naturaleza migradora de muchas especies de aves - especialmente las acuáticas - ha hecho que sean consideradas reservorio y vía de diseminación para diferentes patógenos de importancia en la industria avícola.

Astorga y col. (1994); Meede y col. (1996), sugieren la posibilidad de que las aves acuáticas migratorias, podrían diseminar este virus en el mundo, y que estas tienen las condiciones óptimas para la recombinación genética entre diferentes cepas de influenza aviar tipo A, dando cepas híbridas nuevas. Easterday y col. (2000) sugirió que las aves migratorias quizás, introduzcan este virus a los planteles o grupos de aves domésticas.

Respecto al ave positiva detectada en este estudio, esta fue un ejemplar aparentemente sano (ANEXO 1). Lo que coincide con lo dicho por Easterday y col. (2000), en que las infecciones por VIA en aves silvestres, con la excepción de los casos de mortalidad masiva entre las golondrinas de mar común, han sido inaparentes sin signos evidentes de la enfermedad.

De acuerdo a esto, es importante tomar en cuenta el papel que estas aves pueden tener en la diseminación de la enfermedad hacia la población de aves domésticas, ya que si bien estas cepas suelen ser de baja patogenicidad, pueden cambiar su virulencia y volverse altamente patógenas para las aves de producción (Perdue, 2003).

En cuanto al Cisne de cuello negro, además de distribuirse en Chile, se encuentra también en el sur de Argentina, extremo Sureste de Brasil, Uruguay y ocasionalmente Paraguay (Schlatter, 1998). Según Schlatter y col. (2002) realiza largos desplazamientos a través de estos países principalmente cuando las condiciones de disponibilidad de alimento y hábitat óptimo disminuyen (en relación a fenómenos climáticos como ENOS). La posibilidad de que entren en contacto con aves infectadas de otros países, y después vuelvan con el virus, y lo diseminen a través del resto de las aves aumentan.

Es importante que los trabajos de investigación referidos a especies silvestres cuenten con el apoyo de las instituciones de estado (en este estudio fue el Servicio Agrícola y Ganadero) para que de esta manera los resultados obtenidos puedan ser difundidos y reconocidos oficialmente.

6.2 MYCOPLASMA GALLISEPTICUM Y SALMONELLA SP.

6.2.1 *M. gallisepticum*

La prueba de aglutinación rápida en placa, es utilizada como prueba de rutina en el diagnóstico de *M. gallisepticum* (Nepomuceno da Silva, 2000).

Los resultados de la aglutinación rápida en placa indican que los cisnes muestreados no han estado en contacto con el *M. gallisepticum*. Según el National Wildlife Health Center (2003), la infección por *M. gallisepticum* en aves acuáticas es poco común, siendo de mayor importancia para estas especies *M. anatis*, *M. anseris* y *M. imitans*.

Al parecer esta bacteria tendría mayor importancia en aves terrestres que en acuáticas y habría adquirido gran relevancia durante 1994, a partir de una epidemia de conjuntivitis en gorriones silvestres (*Carpodacus mexicanus*) en los Estados Unidos, diseminándose muy rápidamente entre las aves silvestres del área (Luttrell y col., 2001)

A partir de este suceso, Williams y col. (2002), define a la micoplasmosis como una enfermedad emergente, que entre paseriformes se relaciona entre otros factores, con cambios de hábitat, alimentación artificial y aumento en la densidad poblacional de aves, favoreciéndose así la diseminación de la enfermedad.

El no pertenecer al tipo de aves más susceptible a esta bacteria, y no vivir en las condiciones de estrés mencionadas anteriormente, son indicativos de porque las muestras de los cisnes fueron negativas

6.2.2 *Salmonella sp.*

Sólo resultados negativos se obtuvieron del muestreo realizado para el cultivo de *Salmonella sp* en Cisnes de cuello negro.

En Dinamarca, Nielsen y col. (1981) aisló *Salmonella sp* de 97 cisnes vulgar (*Cygnus olor*) de un total de 605 ejemplares, según el autor la alta frecuencia de aislamiento, se debería al gran número de cisnes ubicados cerca de alcantarillados.

El no haber podido aislar *Salmonella sp* de las muestras analizadas podría ser consecuencia tanto de la ubicación de los Cisnes de cuello negro muestreados, los que se mantiene relativamente lejanos a los alcantarillados como los presentes en la ciudad de Valdivia, además de la posibilidad de que no exista *Salmonella sp* en el río.

Schoebitz (1984) en un estudio realizado en el río Valdivia (Chile). Realizo aislamientos de *Salmonella sp* desde sectores cercanos a los tubos colectores que desembocaban en el río en su recorrido por la ciudad, los serotipos encontrados con mayor frecuencia fueron *S. paratyphi*, *S. typhimurium*, *S. panama*. Cabe destacar que en este momento las aguas contaminadas ya no caen directamente al río sino que son pasadas por una planta de tratamiento de aguas servidas, y por lo tanto, la situación anterior puede haber cambiado en la actualidad.

En años recientes, se han publicado múltiples informes de gaviotas infectadas en sistemas de alcantarillados de granjas y en tubos de descarga de ciudades. Hasta ahora la evidencia indica que las gaviotas son portadoras pasiva de *Salmonella* de corta duración (Wray y Davis, 2000).

Cizek y col. (1994), realizó un estudio en la República Checa, sobre la contaminación del medio con *Salmonella sp* y su incidencia en las aves silvestres, obteniendo resultados positivos en gorriones (*Passer domesticus*), palomas (*Columba livia*) y gaviotas (*Larus canus*). Las aves muestreadas se ubicaban preferentemente en granjas de agricultores y cuerpos de agua cercanos a las ciudades. En el estudio *Salmonella typhimurium* fue el serotipo más comúnmente aislado desde gaviotas.

Igualmente, en Suecia, Wahlstrom y col. (2003) al realizar un estudio para aislar *E. coli*, *Campilobacter*, y *Salmonella sp* de animales silvestres, los resultados positivos que obtuvieron para aves, fueron sólo en gaviotas.

A partir de los resultados, se puede concluir que:

-El número de Cisnes de cuello negro muestreados (52), no representa necesariamente la situación sanitaria de la población de cisnes en el santuario que algunos años supera los 14.000 ejemplares, por lo tanto, los resultados pueden variar en las patologías prospectadas.

-Los métodos diagnósticos utilizados (IHA, Aglutinación rápida en placa, Cultivo Bacteriano) son idóneos para el diagnóstico de las patologías que con ellos se prospectaron. En tanto, que se recomienda el uso de frotis de tonsilas cecales o tórulas cloacales profundas y cultivo en huevos embrionados para el diagnóstico de Influenza aviar.

7. BIBLIOGRAFIA.

- ACHA, P., B. SZYFRES. 1986. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. 2ª ed. Edit. OPS. Washington.
- ALEXANDER, D.J. 1998. Newcastle disease virus and other avian paramyxovirus. En: Charmain, D., J. Glison, M. Jackwood, J. Pearson, W. Reed. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. 4ª edición. Ed. Committee. Estados Unidos, pp. 156- 163.
- ALEXANDER, D.J. 2000. Enfermedad de Newcastle y otras infecciones por Paramixoviridae. En: Calnek B.W., J. Barnes, Ch.W. Beard, L.R. McDougald, M. Saif. Enfermedades de las Aves. 2ª ed. Ed. El Manual Moderno. Mexico, pp. 555- 584.
- ARTOIS, M., R. MANVELL, E. FROMONT, J. SCHWEYER. 2002. Serosurvey for Newcastle disease and avian influenza A virus antibodies in great cormorants from France, *J Wild. Dis.* 38: 169- 171.
- ASTORGA, R., L. LEÓN, M. CUBERO, A. ARENAS, A. MALDONADO, M. TARRADAS, A. PEREA. 1994. Avian influenza in wild waterfowl and shorebirds in the Doñana National Park: serological survey using the ezime- linked immunosorbent assay, *Avian Pathol.* 23: 339- 344.
- BERGEY, D. 1984. Bergey's Manual of Sistematic Bacteriology. Edit Williams and Wilkins. Baltimore.
- BLAXLAND, J. 1951. Newcastle disease in shag and other cormorants and significance as a factor in the spread of this disease among domestic poultry. *Vet. Rec.* 63: 731- 733.
- CERDA, R. 2003. Técnicas de biología molecular aplicadas al diagnóstico y epidemiología de la micoplasmosis aviar. En: XVIII Congr. Latinoamericano de avicultura. Santa Cruz, Bolivia.
- CIZEK, A., I. LITERAK, K. HEJLICEK, F. TREML, J. SMOLA. 1994. Salmonella contamination of the enviroment and its incidence in wild birds. *Zentralbl Veterinarmed B.* 41: 427- 433.
- CONAF, CORPORACIÓN NACIONAL FORESTAL. 1988. Libro rojo de los vertebrados terrestres de Chile, Chile.
- CONAF, CORPORACIÓN NACIONAL FORESTAL. 1999. Plan de Manejo Reserva Nacional Río Cruces. Documento de trabajo N° 325, Ministerio de Agricultura, Chile.

- CONAF, CORPORACIÓN NACIONAL FORESTAL. 2000. Censos de especies de Fauna 1995- 1999, Chile.
- CORTI, P. 1996. Conducta de alimentación y capacidad forrajera del Cisne de Cuello Negro (*Cygnus melancorypha*. Molina. 1782) en humedales de Valdivia. Tesis M.V. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias Veterinarias. Valdivia, Chile.
- EASTERDAY, B., V. HINSHAW, D. HALVORSON. 2000. Influenza. En: Calnek B.W., J. Barnes, Ch. W. Beard, L. R. McDougald , M. Saif. Enfermedades de las aves. 2ª ed. Ed. El Manual Moderno. México, pp. 597-619.
- ESTUDILLO, J. 1998. Influenza aviar: Interrelación aves silvestres- virus de influenza realidades y mitos. En: XVI Congr. Panvet. Las Ciencias Veterinarias con el desarrollo sostenible, Santa Cruz, Bolivia, pp: 59- 64.
- GARCIA, J., M. MENDEZ. 1996. Estudio sobre algunas características de los virus de Influenza aviar de baja patogenicidad aislados en México, de Enero a Septiembre de 1994. En: Memorias de la XXI Conv. Anual ANECA, Cancún, México, pp: 295- 296.
- GAST, R. 2000. Infecciones paratifoideas. En: Calnek B.W., J. Barnes, Ch. W. Beard, L. R. McDougald , M. Saif. Enfermedades de las aves. 2ª ed. Ed. El Manual Moderno. México, pp: 95-118.
- GRAHAM, D., A. GERMAN, D. ABERNETHY, S. Mc CULLOUGH, R. MANUELL, D. ALEXANDER. 1999. Isolation of Ortho- Paramixoviruses from wild birds in Northern Ireland during the 1997 Newcastle disease epizootic. *Vet. Rec.* 145: 20- 21.
- GRAVES, I. 1992. Influenza viruses in birds of the Atlanticflyway. *Avian Dis.* 36: 1- 10.
- JIMENEZ, E. 2001. Biología reproductiva y alimentación de Cormoran yeco (*Phalacrocorax brasilianus*, Gmelin, 1789) en la colonia del Santuario de la Naturaleza del Río Cruces, Valdivia. Tesis B. M. Universidad Austral de Chile. Facultad de Ciencias. Valdivia, Chile.
- KLEVEN, S. 1998. Micoplasmosis. En: Charmain, D., J. Glison, M. Jackwood, J. Pearson, W. Reed. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. 4ª edición. Ed. Committee. Estados Unidos, pp. 74- 80.
- KLEVEN, S. 2000. Micoplasmosis. En: Calnek B. W., J. Barnes, Ch. W. Beard, L. R. McDougald , M. Saif. Enfermedades de las aves. 2ª ed. Ed. El Manual Moderno. México, pp:195- 239.
- LUTTRELL, M., D. STALLKNECHT, S. KLEVEN, D. KAVANAUGH, J. CORN, J. FICHER. 2001. *Mycoplasma gallisepticum* in house finches (*Carpodacus mexicanus*) and other wild birds associated with poultry production facilities. *Avian Dis.* 45: 321- 329.

- MEEDE, S., R. CENICEROS, I. TELLEZ, M. PAASCH. 1996. Influenza aviar en México: Estudio recapitulativo. En: Memorias de la XXI Conv. Anual ANECA, Cancún, México, pp: 301-304.
- MINAGRI. 2002. SAG erradicó enfermedad de tipo viral que afecta a las aves. Chile país libre de Influenza Aviar. (Disponible en: <http://www.agricultura.gob.cl>. Consultado el 03/22/2003).
- MOLINA, I. 1782. *Anas melancorypha*. *Sagg. Ster. Nat.* Chile, pp: 234- 344.
- NEPOMUCENO DA SILVA, E. 2000. Nuevos conceptos en el control de *Mycoplasma aviar*. *AP*, 18:15- 17.
- NIELSEN, B., B. CLAUSEN, K. ELVESTAD. 1981. The incidence of *Salmonella* bacteria in wild-living animals from Denmark and imported animals. *Nord. Vet. Med.* 33: 427- 433.
- OIE, OFICINA INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS. 2002a. Clasificación OIE de las enfermedades. (Disponible en http://www.oie.int/esp/maladies/es_classification.htm Consultado el 27/10/2003).
- OIE, OFICINA INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS. 2002b. Sanidad animal mundial en el 2001. (Disponible en http://www.oie.int/esp/info/es_sam2001.html. Consultado el 27/10/2003).
- OIE, OFICINA INTERNACIONAL DE EPIZOOTIAS. 2002c. Chile. (Disponible en ftp://ftp.oie.int/SAM/2001/CHL_E.pdf. Consultado el 27/10/2003).
- PERDUE, M. 2003. ¿Cómo un virus puede tornarse repentinamente muy patogénico?. *AP* 21: 25- 27.
- PFITZER, S., D. VERWOERD, G. GERDES, A. LABUSCHAGNE, A. ERASMUS, R. MANVELL, C. GRUND. 2000. Newcastle disease and avian influenza A virus in wildwaterfowl in South Africa. *Avain dis.* 44: 655- 660.
- RITCHIE, B. 1995. *Avian Viruses, Function and Control*. Ed. Wingers Publishing. Florida.
- SAG, SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO. 1994. Texto refundido de la ley orgánica del Servicio Agrícola y Ganadero. Chile. (Ley N° 18.755 del 7 de Enero de 1989 y Ley N°19283 del 5 de Enero de 1994, modificatoria de la anterior).
- SCHLATTER, R., R. NAVARRO, P. CORTI. 2002. Effects of el niño Southern Oscillation on number of Black necked Swans at Río Cruces Sanctuary, Chile. En: Rees, E., Earnst, S. Coulson, J. WATERBIRDS Proceedings of the fourth international swan symposium 2001, 25: 114-122. Estados Unidos.

- SCHLATTER, R. 1998. El Cisne de Cuello Negro en Chile. En : La Conservación de la Fauna Nativa de Chile logros y perspectivas. Ed. Victor Valverde. S. CONAF. Ministerio de Agricultura. Chile.
- SCHLATTER, R., J. SALAZAR, A. VILLA, J. MEZA. 1991. Reproduction biology of blacknecked swan (*Cygnus melancorypha*) at three Chilean wetland areas and feeding ecology at Río Cruces. *Wildfowl. Suppl.* 1: 168-271.
- SHOEBITZ, L. 1984. Indicadores de contaminación bacteriológica y presencia de *Salmonella* en aguas del río Valdivia. *Arch. Med.* 16: 83- 92.
- SCOTT, P., W. TRUST, C. PERRINS. 1972. The Swans. Houghton Mifflin Company, Boston, London.
- SLEMONS, R., D. JOHNSON, J. OSBORN, F. HAYES. 1974. Type-A Influenza viruses isolated from Wild free-flying ducks in California. *Avian dis.* 18: 119- 124.
- STANISLAWEK, W., C. WILKS, J. MEERS, G. HORNER, D. ALEXANDER, R. MANVELL, J. KATTENBELT, A. GOULD. 2002. Avian paramyxoviruses and influenza viruses isolated from mallard ducks (*Anas platyrhynchos*) in New Zealand. *Arch. Virol.* 147: 1287- 1302.
- SWAYNE, D., D. SENNE., CH. BEARD. 1998. Avian Influenza. En: Charmain, D., J. Glison, M. Jackwood, J. Pearson, W. Reed. A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. 4ª edición, Ed. Committee. Estados Unidos, pp: 150-155.
- SWAYNE, D., D SUAREZ. 2003. Cambios Biológicos de los virus de influenza aviar de baja a alta patogenicidad. En: XVIII Congr. Latinoamericano de avicultura. Santa Cruz, Bolivia.
- TIZARD, I. 1996. Inmunología veterinaria. 5ª ed. Ed. McGraw-Hill Interamericana. México.
- UHART, M., F. QUINTANA, W. KARESH, W. BRASELTON. 2003. Hematology, plasma biochemistry, and serosurvey for selected infectious agents in southern giant petrels from Patagonia, Argentina. *J. Wildl. Dis.* 39:359- 265.
- U. S. GEOLOGICAL SURVEY. 1999. Field Manual of wildlife disease. U. S. Department of the Interior. Estados Unidos.
- WAHLSTROM, H., E. TYSEN, E. OLSSON ENGVALL, B. BRANDSTROM, E. ERIKSSON, T. MORNER, I. VAGSHOLM. 2003. Survey of *Campilobacter* species, VTEC O157 and *Salmonella* species in Swedish wildlife. *Vet. Rec.* 153: 74- 80.

WILLIAMS, E., T. YUILL, M. ARTOIS, J. FISCHER, S. HAIGH. 2002. Emerging infectious diseases in wildlife. *Rev. Sci. Tech*, 21: 139- 157.

WILSON, J. 1950. Newcastle disease in a gannet (*Sula bassala*). *Vet. Rec.* 62: 33-34.

WRAY, C., R. DAVIES. 2000. Control ambiental de Salmonella. *AP*, 18: 18-21.

ZAMORA, J. 1998. Riesgos epidemiológicos de la fauna silvestre en problemas de salud. En: X Congr. Nac. de Med. Vet. Las Ciencias Veterinarias ante el tercer milenio, Valdivia, Chile, pp: 127- 152.

ANEXO 1.
Fichas de notas.

FICHA 1. Cisnes capturados en la 1ª salida terreno, en el santuario de la naturaleza “Río Cruces”, en el sector de San Ramón el día 7 de Junio del 2003.

n°	sexo		edad		peso	longitud	observaciones
	macho	hembra	juvenil	adulto	Kg	Cm	
1		*	*		4.7	95	
2		*	*		6.6	107	
3		*	*		4.9	97	
4	*			*	8	123	
5		*	*		5	100	
6		*	*		5.5	106	
7		*	*		4.9	98	
8		*		*	5.9	107	
9	*			*	5.3	106	
10		*		*	4.9	107	
11	*			*	5.4	119	
12	*			*	5.9	106	
13		*		*	4.1	104	
14	*			*	4.8	108	
15	*			*	5	104	
16		*		*	6.9	122	
17		*	*		4.5	102	
18	*			*	5.25	113	“alas de angel”
19		*		*	5.9	104	
20	*			*	7	122	

FICHA 2: Cisnes capturados en la 2ª salida terreno, en el santuario de la naturaleza “Río Cruces”, en el sector de San Ramón el día 21 de Junio del 2003.

n°	sexo		edad		peso	longitud	observaciones		
	macho	hembra	juvenil	adulto	Kg	Cm			
21		*	*		4,5	99			
22	*		*		6	114			
23	*		*		6	116			
24		*		*	3,7	100	muñones en ambas patas, Desf. Cond. Corporal		
25	*			*	5,5	123			
26		*		*	4,7	113	"ala de angel" izquierda		
27		*	*		4,7	99			
28	*			*	6,9	110			
29	*		*		5,3	108			
30	*			*	7	121	"ala de angel" izquierda		
31		*	*		4,6	100			
32		*		*	6	108			
33	*		*		5,3	118			
34	*		*		5,8	113			
35	*		*		5,5	103			

FICHA 3: Cisnes capturados en la 3ª salida terreno, en el santuario de la naturaleza “Río Cruces”, en el sector de San Ramón el día 7 de Septiembre del 2003.

n°	sexo		edad		peso	longitud	observaciones
	macho	hembra	juvenil	adulto	Kg	Cm	
36		*		*	6.7	113	muestra cloacal
37		*		*	7	108	muestra cloacal
38	*		*		6	110	muestra cloacal
39		*		*	6.1	111	muestra cloacal
40		*		*	6.7	112	muestra cloacal
41		*		*	7.2	110	muestra cloacal
42	*			*	6.8	114	muestra cloacal
43		*		*	5.	110	muestra cloacal
44		*		*	5.8	109	muestra cloacal
45		*	*		3.9	101	muestra cloacal
46		*		*	5.2	120	muestra cloacal
47	*			*	6.4	115	muestra cloacal
48		*		*	5.9	108	muestra cloacal
49		*	*		5.5	114	muestra cloacal
50	*		*		4	105	muestra cloacal
51	*			*	3	106	muestra cloacal
52		*	*		4	110	muestra cloacal

ANEXO 2
Resoluciones Permisos SAG y CONAF.

ANEXO 2: Resolución permiso SAG.

**Departamento de protección de Recursos Naturales Renovables.
Subdepartamento de Vida Silvestre.**

Fauna N° 1-41/ 2003-11-14

**AUTORIZA A ROBERTO SCHLATTER LA
CAPTURA DE CISNES DE CUELLO NEGRO
CON FINES CIENTIFICOS.**

550
22 agosto 2003

SANTIAGO,

N° 2300 VISTOS: La solicitud del interesado de fecha 12 de junio del 2003; lo dispuesto en la Ley N° 19.473, sobre caza; en el Decreto Supremo N° 5 de Agricultura, de 1998; la Resolución N° 9 de 13 de enero de 1978 del Director Nacional del Servicio Agrícola y Ganadero y La Ley N° 18.755, Orgánica del Servicio.

RESUELVO.

PRIMERO: Autorizase al señor Roberto Schlatter V., CI N° 4.773.676-5, con domicilio en el instituto de Zoología de la Universidad Austral de Chile, y al Sr. Luis Alvarado Aguilar, CI N° 13.527.140-3, con domicilio en la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Austral de Chile, la captura y caza de cisnes de cuello negro (*Cygnus melancorypha*) con fines científicos, de acuerdo a las normas de la presente Resolución.

SEGUNDO: Se autoriza la captura, en forma manual o, mediante redes y lazos, de un máximo de 50 ejemplares de cisnes de cuello negro, dentro de los límites del Santuario de la Naturaleza Carlos Andwanter, Valdivia, a contar desde la fecha de esta resolución y hasta el 31 de octubre del 2004.

Se autoriza el marcaje y la toma de muestras sanguíneas y cloacales, luego de lo cual, las aves deberán ser liberadas en los mismos sitio de captura.

Se autoriza además, la captura y posterior eutanasia de un máximo de 20 ejemplares de cisne de cuello negro que presenten malformaciones o que sean encontrados moribundos.

TERCERO: Los interesados deberán contar además con la autorización de la Corporación Nacional Forestal.

ANEXO 2: Continuación resolución permiso SAG.

CUARTO: Los interesados deberán informar por escrito, a la oficina sectorial SAG Valdivia, las fechas precisas de captura, quienes podrán realizar el control de las actividades si así lo estiman conveniente.

QUINTO: El Sr. Schlatter, en calidad de responsable del proyecto deberán entregar un informe, una vez concluidas las labores de terreno, al Departamento de Protección de Recursos Naturales del Servicio y a la Dirección Regional SAG X Región, de las actividades realizadas, resultados obtenidos; debiendo remitir además, copia de los artículos que sean publicados con los datos obtenidos en terreno, incluidos tesis y presentaciones a seminarios.

SEXTO: Todo incumplimiento observado por parte de los interesados a las disposiciones contenidas en las autorizaciones que se les ha otorgado será denunciado al Director Regional del Servicio Agrícola y Ganadero, quien conocerá de estos hechos según lo establece la Ley de Caza.

**MARIO LAGOS SUBIABRE
INGENIERO AGRONOMO
JEFE DEPARTAMENTO DE PROTECCION
RECURSOS NATURALES RENOVABLES(S)**

ANEXO 2: Resolución permiso CONAF.

**REGION DE LOS LAGOS
U. G. PATRIMONIO SILVESTRES N° 288
U. T. PATRIMONIO SILVESTRES N° 75**

**N° 457.
REF .: AUTORIZA INVESTIGACION EN S.
DE LA NATURALEZA RÍO CRUCES.**

PUERTO MONTT: 23 MAYO 2003.

**SEÑORES.
LUIS ALVARADO AGUILAR.
UNIVERSIDAD AUSTRAL DE CHILE.
CAMPUS ISLA TEJA S/N.
VALDIVIA.**

De mi consideración:

La Corporación Nacional Forestal Región de Los Lagos, autoriza a la Universidad Austral de Chile, para la realización de los estudios de investigación titulado “Prospección de enfermedades virales (influenza aviar, enfermedad de newcastle, enteritis viral del pato) en poblaciones silvestres y cautiverio de cisnes de cuello negro (*Cygnus melancorypha*)”, bajo las condiciones que señala el Reglamento para la Realización de Investigaciones dentro de las Areas Silvestres Protegidas del Estado.

Sin otro particular, saluda atentamente a Ud.,

**PEDRO BAHAMONDEZ BARRIA
DIRECTOR REGIONAL
CONAF REGION DE LOS LAGOS**

ANEXO 2: Continuación resolución permiso CONAF.

**CORPORACION NACIONAL FORESTAL
U.G. PATRIMONIO SILVESTRE
UNIDAD TECNICA U.G.P.S.
DECIMA REGION- PUERTO MONTT**

**AUTORIZACION PARA INVESTIGACION
EN AREAS SILVESTRES PROTEGIDAS
DEL ESTADO**

**CONAF X REGION
AUTORIZACION N° 109
PUERTO MONTT, 22 DE MAYO 2003**

La Corporación Nacional Forestal, X Región, representada por su Director Regional Sr. Pedro Bahamonez Barria, autoriza al Sr. Luis Alvarado Aguilar, Investigador de la Universidad Austral de Chile, con domicilio Campus Isla Teja, Valdivia, para la realización del proyecto titulado **“Prospección de enfermedades virales (influenza aviar, enfermedad de newcastle, enteritis viral del pato) en poblaciones silvestres y cautiverio de cisnes de cuello negro (*Cygnus melancorypha*)”**, desde Mayo 2003 a Diciembre 2003.

Los investigadores asociados son:

- Roberto P. Schlatter V.

Mediante el presente instrumento la Corporación Nacional Forestal X Región, como Organismo Administrador y Rector del Sistema Nacional de Áreas Silvestres Protegidas del Estado de Chile y en particular de la Reserva Nacional del Río Cruces, Valdivia, acorde al Reglamento de Investigaciones en el interior de estas Áreas, autoriza el estudio en los siguientes términos.

ANEXO 2: Continuación resolución permiso CONAF.

Se autoriza la realización de este proyecto en la Unidad del SNASPE anteriormente mencionadas, con la salvedad que el investigador debe realizar sus actividades en terreno de tal forma que estas causen la menor alteración de estas áreas.

Se autoriza el apoyo de Guardas de CONAF y el transporte fluvial en el sitio Ramsar, cuando sea necesario y si éste no altera el normal funcionamiento de la Unidad, previa coordinación con el Encargado de la U. G. Patrimonio Silvestre de Valdivia. El combustible deberá ser cancelado por el proyecto.

Se autoriza la captura, obtención de muestras y devolución a su medio de una cifra máxima de 50 individuos (*Cygnus melancorypha*).

OBSERVACIONES:

El Investigador deberá tomar contacto con el encargado de U: G. P. S. de la Zona de Valdivia, y en su defecto con el guarda parque del sector, previo a cada visita que se realice a la Unidad con motivos de estudio.

El Investigador deberá remitir a esta Dirección Regional cuatro (4) ejemplares de los informes parciales y finales que surja de esta investigación, con un plazo máximo de seis meses después del final del proyecto.

CONAF se reserva el derecho de incorporar a uno o más funcionarios de la institución en las actividades de terreno de la Investigación.

El Investigador se compromete a respetar las normas legales y técnicas de las Áreas Silvestres Protegidas y las indicaciones que CONAF le señale.

En caso que el Investigador requiera algún otro tipo de apoyo, éste deberá coordinarlo directamente con la U. G. Patrimonio Silvestre de la Décima Región en calle Amunátegui 500 Puerto Montt.

CONAF, no se responsabiliza por daños, deterioro o pérdida de equipos instrumentos, que instale el Investigador dentro de la Unidad donde se realizara el estudio, ocasionado por causas de derrumbes, incendios, temporales, inundaciones, robo, vandalismos, sismos, o cualquier otra causa, para todos los efectos el único responsable es el Investigador.

ANEXO 2: Continuación resolución permiso CONAF.

El investigador deberá estar dispuesto a realizar una charla donde se realicen los estudios, con relación a su investigación, lo que deberá coordinar directamente con el administrador de la Unidad o encargado de Zona. Además deberá estar dispuesto a dictar otra charla al personal técnico de CONAF si la Corporación lo requiere, en coordinación con la U. G. P. S. de la X Región en sus oficinas de CONAF en Puerto Montt, Calle Amunátegui N° 500.

La presente autorización es sin perjuicio de las que corresponda dar a particulares de predios privados, otros servicios o autoridades, de acuerdo, a las disposiciones legales o reglamentarias vigentes que se establezcan y cuya tramitación será de exclusiva responsabilidad del Investigador.

Durante las actividades en terreno, los Investigadores no deberán dejar desechos ni realizar alteraciones en las Unidades que visite.

En conformidad con el compromiso contraído por la investigadora en su solicitud de investigación con fecha 19 de mayo 2003, éste declarara conocer y se compromete a cumplir las normas del Reglamento sobre Proyectos de Investigación en Áreas Silvestres Protegidas del Estado de Chile.

NOMBRE : PEDRO BAHAMONDEZ BARRIA

CARGO : DIRECTOR REGIONAL X REGION, CONAF

FECHA : 22 DE MAYO DE 2003.

AGRADECIMIENTOS.

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a todas aquellas personas que de alguna u otra forma hicieron posible la realización de este trabajo.

Con especial reconocimiento a:

Dr. Roberto Schlatter V. Prof. Patrocinante por su apoyo y buena disposición.

Dr. Jorge Ulloa H. por su ayuda y cooperación en todo momento.

Dr. Christian Matthieu y Servicio Agrícola y Ganadero por la colaboración prestada.

A la familia Alvarado – Velásquez, por la paciencia y cooperación entregada durante los años de estudio.

A Astrid, por sus palabras de apoyo en los momentos difíciles.

A mis amigos y amigas, por su ayuda desinteresada durante todo este periodo.