

UNIVERSIDAD TÉCNICA NACIONAL

SEDE ATENAS

LICENCIATURA EN MEDICINA VETERINARIA CON ÉNFASIS EN BUIATRÍA

**ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO SOBRE EL VIRUS DE LA INFLUENZA AVIAR EN
AVES SILVESTRES LOCALIZADAS EN CENTROS DE RESCATE DE VIDA
SILVESTRE DEL VALLE CENTRAL Y DETERMINACIÓN DE SU PRESENCIA EN
AVES SILVESTRES DE VIDA LIBRE MUERTAS O ENFERMAS REPORTADAS
AL SENASA EN COSTA RICA DURANTE EL 2023**

**TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE GRADO
EN MEDICINA VETERINARIA**

BEATRIZ CANO MURRIETA

ATENAS, COSTA RICA

2023

DECLARACIÓN JURADA

Yo Beatriz Cano Murrieta portadora de la cédula de identidad número 207940072 estudiante de la Universidad Técnica Nacional, UTN en la carrera de Medicina Veterinaria con Énfasis en Buiatría, condecorador (a) de las sanciones legales con que la Ley Penal de la República de Costa Rica castiga el falso testimonio y el delito de perjurio que pueda ocasionarse ante el (la) Director (a) de Carrera y quienes constituyen el Tribunal Examinador de este trabajo de investigación, juramos solemnemente que este trabajo de investigación es una obra original respetando las leyes y que ha sido elaborada siguiendo las disposiciones exigidas por la Universidad Técnica Nacional, UTN, así como con los derechos de autor.

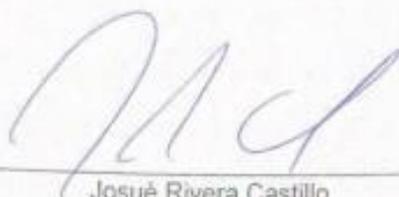
En fe de lo anterior, firmamos en la ciudad de Atenas, a los 22 días del mes de setiembre del 2023.



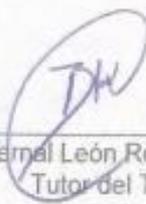
Beatriz Cano Murrieta
207940072

HOJA DE APROBACIÓN

Este Trabajo Final de Graduación fue aprobado por el Tribunal Evaluador como requisito parcial para optar al grado de Licenciatura en Medicina Veterinaria con Énfasis en Buiatría.



Josué Rivera Castillo
Director de Carrera



Bernal León Rodríguez
Tutor del TFG



Josimar Estrella Morales
Lector TFG



Randall Arguedas Porras
Lector TFG

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, quisiera agradecer a mis padres por apoyarme en todo lo posible durante mi carrera universitaria, por brindarme motivación y enseñarme a nunca rendirme. A mi hermana, por darme un ejemplo de que los sueños se pueden cumplir y al resto de mi familia que siempre me dieron palabras de aliento. Seguidamente, quiero agradecer a mi tutor Bernal León por permitirme desarrollar un tema planteado en vida silvestre, además de brindarme la oportunidad de aprender a realizar algunas técnicas de laboratorio, agradecer también a las personas que me ayudaron en este proceso Olga, Guisella e Idania, a mis lectores Josimar Estrella y Randall Arguedas por ayudarme a mejorar el proyecto. Agradecer, también, a los médicos veterinarios que me permitieron realizar visitas en los centros de rescate y me acompañaron en el muestreo, Santiago García, Raquel Meneses, Isabel Hagnauer, Eloísa Astorga, Janet Sandí y Jorge Zamora, pues sin la ayuda de ustedes este proyecto no hubiera sido posible; de igual forma a los voluntarios y estudiantes que me ayudaron con la sujeción de las aves. Por último, quiero agradecer a mis compañeros y amigos que siempre me incentivan a seguir adelante, en especial a Carlos, Pablo, Kevin y Melissa.

RESUMEN

Título: Estudio epidemiológico sobre el virus de la influenza aviar en aves silvestres localizadas en centros de rescate de vida silvestre del Valle Central y determinación de su presencia en aves silvestres de vida libre muertas o enfermas reportadas al SENASA en Costa Rica durante el 2023.

Autor: Beatriz Cano Murrieta

La influenza aviar es un virus zoonótico que afecta a las aves y mamíferos. Pertenece al tipo A, el cual se divide en subtipos que presentan dos proteínas de superficie en conjunto, hemaglutinina y neuraminidasa. Su transmisión es principalmente por aves silvestres acuáticas y migratorias. El presente trabajo determinó la ausencia de IA en aves silvestres localizadas en centros de rescate de fauna silvestre del Valle Central de Costa Rica y reportó la presencia en aves silvestres de vida libre reportadas muertas o enfermas al SENASA, mediante pruebas de detección de antígeno.

Se obtuvieron 200 muestras de hisopado cloacal de aves silvestres en centros de rescate del Valle Central y se les realizó la prueba rápida de inmunocromatografía para detección de antígeno de IA, donde no se detectó ningún resultado positivo. Se reportaron 45 aves con signos clínicos compatibles a IA y 14 aves muertas, se detectó un 25.42% de aves positivas a la prueba de qRT-PCR, 2 *Falco peregrinus* y 13 *Pelecanus occidentalis*. El análisis estadístico Chi-cuadrado (χ^2) demostró una relación entre la enfermedad y las variables de orden, especie y origen. Se determinó la presencia del virus en 4 regiones del país, siendo la región Pacífico Central con más casos. Se concluyó que los primeros casos positivos al virus de IA en el país se detectaron en aves silvestres de vida libre.

Palabras clave: Influenza, Aves, Silvestres, qRT-PCR, Inmunocromatografía.

Índice general

I. INTRODUCCIÓN	11
1.1 Problemática	13
1.2 Justificación	14
1.3 Antecedentes	15
1.4. Objetivos	17
1.4.1 Objetivo general	17
1.4.2 Objetivos específicos	17
II. MARCO TEÓRICO	18
2.1 Influenza Aviar	18
2.1.1 Etiología	18
2.1.2 Patogénesis	19
2.1.3 Transmisión	19
2.1.4 Signos clínicos	20
2.1.5 Pruebas diagnósticas	20
2.1.6 Zoonosis y prevención	22
2.2 Aves silvestres	23
2.3 Centros de rescate de vida silvestre en Costa Rica	25
III. MARCO METODOLÓGICO	27
3.1 Área de estudio	27
3.2 Determinación de la muestra	28

3.3 Recolección de muestras	29
3.4 Prueba rápida de inmunocromatografía	30
3.5 Extracción de ARN.....	31
3.6 Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (qRT-PCR)	32
3.6 Análisis estadístico de datos	33
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
4.1 Aves silvestres en centros de rescate	35
4.2 Aves silvestres reportadas	39
V. CONCLUSIONES	50
VI. RECOMENDACIONES.....	51
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
VIII. ANEXOS.....	60

Índice de figuras

Figura 1 <i>Especies de aves del orden Anseriformes en Costa Rica</i>	24
Figura 2 <i>Especies de aves del orden Charadriiformes en Costa Rica</i>	25
Figura 3 <i>Mapa de ubicación de centros de rescate del Valle Central</i>	28
Figura 4 <i>Interpretación de resultados de la prueba rápida de inmunocromatografía para IA</i>	31
Figura 5 <i>Resultado positivo de la prueba qRT-PCR de la especie Pelecanus occidentalis</i>	41
Figura 6 <i>Resultado positivo de la prueba qRT-PCR de la especie Falco peregrinus</i>	41
Figura 7 <i>Localización de casos positivos a influenza aviar en Costa Rica según especie</i>	43
Figura 8 <i>Proporción de casos positivos entre las regiones de Costa Rica, mostrando un intervalo de confianza del 95%</i>	46

Índice de tablas

Tabla 1 <i>Tabla de registro de aves silvestres a muestrear.....</i>	30
Tabla 2 <i>Primers y sondas a utilizar en el qRT-PCR para amplificación del virus de la influenza aviar.....</i>	33
Tabla 3 <i>Resultados de las muestras a la prueba rápida de inmunocromatografía para detección del virus de la influenza aviar en aves silvestres localizadas en centros de rescate del valle central.....</i>	35
Tabla 4 <i>Resultados de las muestras a la prueba de qRT-PCR y prueba Anigen Rapid AIV Ag para detección del virus de la influenza aviar en aves silvestres reportadas al SENASA según orden taxonómico y especie</i>	39
Tabla 5 <i>Registro de muestras positivas al virus de la influenza aviar según especie y origen.....</i>	42
Tabla 6 <i>Resultados del análisis estadístico Chi cuadrado (χ^2) en variables de orden, especie y origen con respecto a la presencia del virus de la influenza aviar en aves silvestres</i>	44
Tabla 7 <i>Resultados de las muestras a la prueba de qRT-PCR para detección del virus de la influenza aviar en aves silvestres en vigilancia activa por el SENASA según orden taxonómico y especie.....</i>	47

Índice de ecuaciones

Ecuación 1 <i>Fórmula para el cálculo de muestra de población infinita.....</i>	28
--	----

Índice de abreviaturas

CONAGEBIO Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad

HA	Hemaglutinina
IA	Influenza Aviar
IAAP	Influenza Aviar de Alta Patogenicidad
IABP	Influenza Aviar de Baja Patogenicidad
LANASEVE	Laboratorio Nacional de Servicios Veterinarios
MINAE	Ministerio de Ambiente y Energía
NA	Neuraminidasa
NP	Nucleoproteína
OIE/OMSA	Organización Mundial de Salud Animal
RNPs	Partículas Ribonucleoproteicas
qRT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa con Transcripción Inversa
Tiempo Real	a
SAG	Servicio Agrícola y Ganadero de Chile
SENASA	Servicio Nacional de Salud Animal
SINAC	Sistema Nacional de Áreas de Conservación

I. INTRODUCCIÓN

La influenza aviar (IA) es un virus zoonótico que afecta a las aves y mamíferos. Este pertenece al tipo A, el cual se divide en subtipos que presentan dos proteínas de superficie en conjunto, hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). La propagación de

esta enfermedad puede presentarse a partir de factores como el comercio internacional legal e ilegal de aves silvestres, comercialización de aves de corral, presencia de aves migratorias o fómites; por lo cual, el riesgo de transmisión a los humanos es alto, de tal manera que su forma altamente patógena se encuentra en la categorización de la lista A de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), siendo de declaración obligatoria los subtipos H5 y H7 (Buscaglia, 2004; Blagodatski et al., 2021).

Actualmente, existen diferentes métodos de diagnóstico para la identificación de la IA, entre ellos los que detectan el agente como el aislamiento viral, kits de inmunocromatografía, reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (qRT-PCR), o bien, pruebas que detectan la respuesta inmune como kits de enzimoimmunoanálisis (ELISA), inmunodifusión en gel de agar, pruebas de hemaglutinación y de inhibición de la hemaglutinación (Perera et al., 2011; OIE, 2021).

La manifestación de la enfermedad puede variar según factores como edad, especie, ambiente y características de la cepa vírica, con una presentación clínica que va desde signos respiratorios, neurológicos o digestivos, hasta la muerte súbita, más ninguno es patognomónico. Generalmente, la tasa de mortalidad va de la mano con la morbilidad, por lo que resulta importante diagnosticar la enfermedad a tiempo para tomar las medidas respectivas (OIE, 2021).

El presente trabajo busca determinar si hay aves silvestres en centros de rescate del Valle Central de Costa Rica y/o aves silvestres en vida libre positivas a este virus mediante la prueba de inmunocromatografía de AIV (Bionote, Gyeonggi-do, Korea) y su confirmación por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real, además de establecer la prevalencia de la enfermedad en los centros de rescate y evaluar la posible relación entre variables de

orden, especie y origen, con el fin de generar datos actualizados sobre el rol del virus de IA, de importancia para la salud pública del país.

1.1 Problemática

El virus de la influenza aviar es el responsable de afectar distintas especies, dentro de las cuales se encuentran las aves de corral, aves silvestres, aves acuáticas, mamíferos como: perros, gatos, cerdos, ratones y humanos. Este virus, presenta una variabilidad excesiva y es sumamente contagioso, hecho por el cual posee un gran potencial para causar una epidemia o pandemia; se puede manifestar con signos clínicos leves o pacientes asintomáticos, influenza aviar de baja patogenicidad (IABP), u ocasionando signos clínicos graves e inclusive la muerte, influenza aviar de alta patogenicidad (IAAP), (CFSPH, 2010; Anis et al., 2018).

Las aves silvestres generalmente son portadoras de los virus de la IABP, por lo tanto, pueden transmitir con facilidad el virus a las aves de corral vía fecal-oral o vía aerógena; una vez el virus haya ingresado a la parvada, este puede mutar para convertirse en virus de la IAAP, lo que podría provocar que varias o todas las aves presenten la enfermedad y, consecuentemente, haya mayor riesgo de zoonosis para las personas que trabajan o mantienen contacto con las aves de corral (CFSPH, 2010). Además, se sabe que la ruta migratoria de las aves silvestres terrestres y acuáticas, puede facilitar la dispersión del virus desde Norteamérica hasta Sudamérica (Rondón et al., 2013).

En Costa Rica se han reportado la presencia de 23 especies del orden anseriformes pertenecientes a la familia Anatidae (Garrigues et al., 2022) dentro de las cuales se encuentran *Spatula discors* (Marín et al., 2018) y *Spatula clypeata* (Alvarado, 2006; Garrigues et al., 2022), especies que anteriormente resultaron

positivas al virus de la IA en Centroamérica (González et al., 2016). Asimismo, se encuentran 446 especies del orden Passeriforme (Garrigues et al., 2022), aves que se han asociado a brotes de IA en años anteriores en países asiáticos (Fujimoto, 2015). Gran parte de estas aves son migratorias, por lo que el riesgo de acarrear la enfermedad aumenta (CFSPH, 2010).

En el país, solo se ha realizado un estudio para evaluar la presencia de anticuerpos contra IA, el cual resultó negativo, sin embargo, el muestreo fue dirigido a aves de corral y fue ejecutado en un único pueblo; aunado a esto, la prueba de diagnóstico fue mediante inmunodifusión en gel de agar, una prueba poco sensible, aunque bastante específica para la detección de la enfermedad (Hernández et al., 2008). Por lo tanto, hay una falta de información sobre la presencia del virus en aves silvestres que, aunque no manifiesten signos clínicos, son los principales reservorios y propagadores de la enfermedad (Pérez et al., 2011).

1.2 Justificación

En Costa Rica existe una gran diversidad de aves silvestres distribuidas por todo su territorio que podrían acarrear enfermedades perjudiciales para la salud humana y la salud de otros animales. Las aves silvestres acuáticas, principalmente del orden Anseriforme, son reservorios de la enfermedad del virus de la influenza aviar tipo A, por lo que alojan el virus en el tracto respiratorio o intestinal, por lo general sin desarrollar signos de la infección (Pérez et al., 2011; SENASAG, 2016).

El virus de IA es zoonótico, resulta ser una amenaza para la salud pública debido a su elevada capacidad para mutar continuamente y adaptarse a varias especies incluyendo los humanos. Además, en caso de que se experimente un brote,

las pérdidas económicas para la industria alimentaria y las granjas de aves de corral serían devastadoras (Buscaglia, 2004).

El uso de pruebas rápidas de inmunocromatografía para el diagnóstico de la influenza tipo A posee la ventaja de fácil realización, donde se obtienen resultados en pocos minutos y es altamente específico (Wibowo et al., 2016). No obstante, la sensibilidad de esta prueba es baja, por lo que se busca confirmar la presencia del virus mediante una prueba molecular para la detección directa de ARN, siendo esta la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (qRT-PCR), la cual se ha demostrado que es una prueba con una alta sensibilidad y especificidad generando un resultado confiable y oportuno para la toma de decisiones de los veterinarios responsables de la situación ante un caso positivo (Perera et al., 2011).

La importancia de realizar este estudio radica en obtener información sobre el estado actual de la influenza aviar en el país, a través del muestreo de las aves silvestres que habitan en centros de rescate, dado que son posibles aves reservorios migratorias o residentes que han estado en libertad, acarreado el virus de la influenza aviar. A partir de los resultados de este estudio, se puede tener un panorama más claro sobre el rol del virus de la influenza aviar en el país, ya que no se ha realizado ningún estudio que involucre aves silvestres acuáticas y terrestres en los años anteriores.

1.3 Antecedentes

Se determinó la presencia del virus de la influenza aviar mediante la técnica de qRT-PCR en el Estado de Alaska a lo largo del año 2005, donde se muestrearon 880 aves de la familia Anatidae resultando un 25,6% positivos sin ninguna relación entre

la presencia de la enfermedad y el sexo o edad (Runstadler et al., 2007), países como Chile durante los años 2007-2009, donde se detectaron 4 muestras positivas de 79 aves muestreadas (Mathieu et al., 2015), Carolina de Norte, Estados Unidos en el periodo del año 2004 al 2006, se muestrearon 3413 aves del orden Anseriforme, de las cuales el 0,8% resultaron positivas (Goekjian et al., 2011), Lima, Perú durante los años 2008-2009, el 0.78% de 900 aves silvestres se encontraban positivas (Segovia et al., 2013), Guatemala 2010-2013, se muestrean 1250 aves migratorias incluyendo las especies *Spatula clypeata*, *Anas discors* y *Anas carolinensis* de las cuales el 25,28% estuvieron positivas al virus de IA (González et al., 2016), en Corea del Sur y Japón, se realizó una recolección de 980 muestras de heces de aves acuáticas migratorias durante el año 2014 hasta el 2015, se encontró un total de 11 aves positivas (kwon et al., 2016). Para los años 2014-2016, se reporta un brote de influenza aviar que afectó alrededor de 82 aves silvestres (David, 2016).

En Costa Rica se llevó a cabo un muestreo sanguíneo, recolección de heces y ectoparásitos de 151 gallinas seleccionadas de granjas al azar ubicadas en Monteverde, Puntarenas, con el fin de evaluar la presencia de patógenos incluyendo el virus de la influenza aviar. La prueba de diagnóstico usada fue un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA; IDEXX®) a partir del análisis de suero. Se detectó que, en un total de 118 muestras, 12 presentaron seropositividad aumentada según el rango de referencia de la prueba, es decir, elevada presencia de anticuerpos, por lo que se procedió a realizar inmunodifusión en gel de agar; de esta última prueba no se evidenció ninguna muestra positiva (Hernández et al., 2008).

1.4. Objetivos

1.4.1 *Objetivo general*

Determinar la prevalencia del virus de la influenza aviar durante el periodo de enero 2023 a agosto del 2023 en aves silvestres de centros de rescate de fauna silvestre del Valle Central de Costa Rica y la presencia o ausencia del virus en aves silvestres reportadas al SENASA como muertas o enfermas en otras zonas del país mediante la prueba de qRT-PCR, para el conocimiento comportamental del agente.

1.4.2 *Objetivos específicos*

- Determinar la presencia del virus de la influenza aviar en aves silvestres de centros de rescate del Valle Central y en aves silvestres reportadas al SENASA como muertas o enfermas en otras zonas del país, mediante la prueba inmunocromatográfica Anigen Rapid AIV Ag®, para la selección de muestras a procesar por qRT-PCR.
- Establecer la prevalencia del virus de influenza aviar en aves silvestres de centros de rescate del Valle Central de las muestras positivas a la inmunocromatografía, mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (qRT-PCR) para la actualización del estatus del virus en el país para estas especies.
- Identificar la relación entre la prevalencia del virus de influenza aviar (muestras positivas a qRT-PCR) y las variables orden taxonómico, especie y origen por medio de Chi-cuadrado (χ^2) para el conocimiento del comportamiento del virus en la población muestreada.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Influenza Aviar

2.1.1 Etiología

El virus de IA pertenece al género *Influenzavirus A* de la familia *Orthomyxoviridae*. La IA es un virus ARN segmentado, envuelto y de polaridad negativa que codifica 10 proteínas y se divide en subtipos según la combinación de dos glicoproteínas de superficie, hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA), de las cuales se conocen 16 (H1-H16) y 9 (N1-N9) respectivamente. Se clasifican según su capacidad de causar enfermedad y mortalidad en virus de IAAP y IABP (Hill et al., 2022) Frecuentemente, ocurren mutaciones y reagrupamiento de genes entre los virus, por lo que la IABP puede convertirse en virus de IAAP. Se conocen linajes de Eurasia y Norteamérica de IABP en aves silvestres (Buscaglia, 2004; CFSPH, 2022).

Existen otras proteínas de importancia que conforman el virus de la influenza aviar, como las subunidades de la polimerasa PB2, PB1 y PA las cuales reconocen el cap ARNm, elongan el ARN y se encargan de la actividad de la proteasa respectivamente; la nucleoproteína (NP) tiene la función de unión del ARN viral necesario para la replicación y regulación de importación de ARN viral al núcleo, mientras que la exportación es regulada por la proteína de matriz (M1), la actividad de canal iónico se da a partir de la proteína integral de la membrana (M2), la expresión génica de la célula huésped es regulada por la NS1 y la exportación de los nuevos complejos ribonucleicos del núcleo tras la replicación del virus es por la proteína NS2 (Rimondi, 2014).

2.1.2 Patogénesis

Inicia tras la ingesta o inhalación de partículas virales de IA. Una vez en el organismo la glicoproteína HA tiene la función de identificar y unirse a los restos de ácido siálico en la membrana celular de la célula diana una vez ocurrida la adsorción, el virus entra a la célula por endocitosis dependiente de un pH ácido para vincularse con las membranas endosomales, luego se da el desnudamiento mediante un cambio estructural de la HA que permite la salida de las partículas ribonucleoproteicas (RNPs) al citoplasma, las cuales, tras un proceso activo, son captadas por el núcleo donde se lleva a cabo la transcripción y replicación viral, finalmente los virus se ensamblan y se liberan por la membrana apical de la célula infectada (Rimondi, 2014).

En el caso de IAAP, los viriones ubican la submucosa, ingresan a los vasos capilares y se replican en las células endoteliales, por lo que ocurre una diseminación del virus a través del sistema vascular y linfático que concluye en la replicación e infección viral en diferentes células de órganos viscerales, cerebro y piel. Mientras tanto, ante el virus de IABP la replicación será a nivel de vías respiratorias y/o intestinales (Rimondi, 2014).

2.1.3 Transmisión

La diseminación del virus es a través de aves silvestres migratorias que son reservorios de la enfermedad. Estas transportan el virus en el tracto respiratorio o intestinal y lo excretan por medio de las heces, saliva y secreciones nasales. La infección en aves de corral es generalmente vía fecal-oral pero también puede ocurrir vía aerógena o fecal-cloacal. Además, se puede transmitir el virus por medio de fómites como ropa, zapatos, vehículos, jaulas, piensos o equipo contaminado. Las moscas pueden tener un papel como vector mecánico (Wallesten, 2006).

El virus de IA puede permanecer largos periodos de tiempo en ambientes de baja temperatura, principalmente acuáticos; el subtipo H5N1 puede persistir aproximadamente 35 días a una temperatura de 4C°, mientras que en temperaturas más altas (24C°) ronda una sobrevivencia de hasta 5 días (Kurmi et al., 2013).

2.1.4 Signos clínicos

La enfermedad en las aves silvestres generalmente es asintomática, sin embargo, en algunos casos se pueden mostrar signos clínicos como pérdida de peso, sinusitis, diarrea verdosa oscura, opacidad corneal, signos neurológicos, muerte súbita (Rose et al., 2006).

En aves de corral comúnmente se manifiestan signos como depresión, pérdida de apetito, tos, sinusitis, secreción nasal-oral sanguinolenta, equimosis en las patas, edema y cianosis en la cabeza, cresta y barbilla con pérdida de plumas, baja o nula producción de huevos, producción de huevos despigmentados, deformes y/o sin cáscara, muerte repentina (Ferrer et al., 2023).

En los humanos se puede mostrar con signos clínicos respiratorios que van desde una leve tos hasta una grave neumonía, síndrome de dificultad respiratoria aguda, shock y/o signos clínicos gastrointestinales como diarrea, náuseas, vómitos y dolor abdominal. Asimismo, se han reportado muertes que abarcan hasta un 60% de la población enferma (CFSPH, 2010; Alcántara, 2019; Uyeki & Peiris, 2019).

2.1.5 Pruebas diagnósticas

2.1.5.1 Prueba rápida de inmucromatografía.

Es un dispositivo de flujo lateral para la detección del antígeno de influenza aviar, el cual usa un anticuerpo primario monoclonal o policlonal específico dirigido contra nucleoproteína del virus, seguido de un anticuerpo secundario ligado a un

indicador cromogénico para evidenciar un resultado positivo. Es una prueba muy práctica, ya que es fácil de realizar e interpretar, se puede utilizar de forma inmediata ante la sospecha de la enfermedad y se obtienen resultados rápidos (Wibowo et al., 2016; OIE, 2021). La sensibilidad de esta prueba es de 88.9%, por lo cual se considera baja y puede variar según la especie y tipo de muestra que se toma (hisopado cloacal o traqueal) por lo que se recomienda realizar en conjunto con otras pruebas como aislamiento viral o pruebas moleculares como RT-PCR (Cattoli, 2004; OIE, 2021).

2.1.5.2 Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (qRT-PCR).

Es una prueba molecular rápida con alta sensibilidad (93.3%) y especificidad (98.4%) que detecta el subtipo específico de ARN vírico mediante cebadores, así como la identificación de ADNc para la secuenciación de nucleótidos (Cattoli, 2004). La técnica se basa en la extracción del ARN para su posterior retrotranscripción en un termociclador, donde finalmente se separan las cadenas de ADN para que se unan los primers específicos. Se han descrito diferentes ensayos de qRT-PCR que sirven para la amplificación de partes del gen de la matriz (M) para la determinación del tipo y gen de la HA (HA2), los cuales sirven para determinar la presencia del virus de la influenza aviar de cualquiera de los subtipos de HA y específico diagnóstico de subtipos H5 y H7 respectivamente. Este método se basa en una sonda de hidrólisis que genera una señal de fluorescencia específica de la diana. Se debe tener en cuenta que las sondas para la identificación de subtipos son específicas de la región, por lo tanto, la sonda de detección para los subtipos H5 y H7 de Norteamérica podrían no identificar las mismas cepas del linaje euroasiático (Cattoli, 2004; Perera et al., 2011; OIE, 2021).

2.1.6 Zoonosis y prevención

La enfermedad ocasionada por el virus de la influenza aviar es de carácter zoonótico, lo cual quiere decir que los animales pueden transmitirla a los humanos. La infección ocurre por contacto directo con las aves infectadas o espacios contaminados; por esta razón, las personas que mantienen contacto estrecho con aves silvestres o de corral, como es el caso de aves silvestres en cautiverio, en comercio o aves domésticas en granjas, son susceptibles a contraer la enfermedad (Sánchez et al., 2020).

Algunas medidas a tomar en cuenta para disminuir el riesgo de contagio son el uso ropa de protección, mascarillas, guantes, botas, desinfección del personal a la salida y entrada, desinfección del equipo, medidas de vigilancia y diagnóstico, cuarentena de aves de nuevo ingreso en las instalaciones o enfermas, vacunación de aves de corral y demás pautas que cumplan con un plan de bioseguridad (Buscaglia, 2004; OIE, 2021).

La IA está categorizada en la lista A de enfermedades del código Sanitario para los Animales Terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE). Los subtipos H5 y H7 de alta patogenicidad son de declaración obligatoria a la OIE. Además, según el *Código Sanitario para los Animales Terrestres* se debe cumplir con un programa de vigilancia en todos los países para la detección del virus en las aves y en casos de parvadas positivas se debe seguir un protocolo de “sacrificio sanitario” que implica el descarte de los animales infectados y expuestos, destrucción adecuada de cadáveres y productos animales, desinfección completa de instalaciones y periodo de observación mínimo de 21 días antes de ingresar una nueva parvada (OIE, 2021).

2.2 Aves silvestres

Las aves silvestres migratorias y acuáticas se conocen como los principales reservorios del virus de la influenza aviar. Se ha reportado en distintos estudios que las aves pertenecientes al orden Anseriformes y Charadriiformes generalmente presentan el virus (Venkatesh et al., 2018).

El orden Anseriforme se divide en las familias Anhimidae, Anseranatidae y Anatidae, son aves palmípedas, que por lo general habitan cerca de cuerpos de agua. En Costa Rica se encuentran 23 especies de la familia Anatidae, comúnmente migratorias como *Spatula discors*, *Spatula clypeata*, *Spatula cyanoptera*, *Mareca americana*, *Anas platyrhynchos*, *Anas acuta*, *Anas crecca*, *Aythya collaris* y *Aythya affinis*, residentes como *Dendrocygna autumnalis*, *Dendrocygna bicolor* y *Cairina moschata* (figura 1).

Las aves del orden Charadriiformes también forman parte de la comunidad de aves acuáticas, se conocen comúnmente como aves playeras y se caracterizan por realizar migraciones de largas distancias, recorriendo hasta 25 000 km, generalmente rutas desde el Ártico hasta Asia, África y Suramérica (Villareal, 2010). En Costa Rica se encuentran 8 familias con 84 especies, algunas como *Actitis macularius*, *Charadrius vociferus*, *Creagrus furcatus*, *Gallinago delicata*, *Haematopus palliatus*, *Himantopus mexicanus*, *Jacana spinosa*, *Numenius americanus*, *Pluvialis squatarola*, *Stercorarius maccormicki*, *Thalasseus albididorsalis*, *Vanellus chilensis* (figura 2) (Ríos et al., 2007; Garrigues et al., 2022).

Figura 1

Especies de aves del orden Anseriformes en Costa Rica. a) *Spatula discors*, b) *Spatula clypeata*, c) *Spatula cyanoptera*, d) *Mareca americana*, e) *Anas platyrhynchos*, f) *Anas acuta*, g) *Anas crecca*, h) *Aythya collaris*, i) *Aythya affinis*, j) *Dendrocygna autumnalis*, k) *Dendrocygna bicolor*, l) *Cairina moschata*.



Fuente: Garrigues et al., 2022.

Figura 2

Especies de aves del orden Charadriiformes en Costa Rica. a) *Actitis macularius*, b) *Charadrius vociferus*, c) *Creagrus furcatus*, d) *Gallinago delicata*, e) *Haematopus palliatus*, f) *Himantopus mexicanus*, g) *Jacana spinosa*, h) *Numenius americanus*, i) *Pluvialis squatarola*, j) *Stercorarius maccormicki*, k) *Thalasseus albididorsalis*, l) *Vanellus chilensis*



Fuente: Garrigues et al., 2022.

2.3 Centros de rescate de vida silvestre en Costa Rica

Un centro de rescate se define como un sitio de manejo de vida silvestre con fines de recuperación de animales rescatados, decomisados o entregados por voluntad, para su posterior liberación a su hábitat natural (SINAC, 2021).

En Costa Rica existen registrados 22 centros de rescate por el Sistema Nacional de Áreas de Conservación (SINAC); esta es la principal organización que vela por que se cumpla con la Ley de Conservación de la Vida Silvestre, en conjunto

con otras entidades como el Ministerio de Ambiente y Energía de Costa Rica (MINAE) y la Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad (CONAGEBIO) (SCIJ, 2020; SINAC, 2021).

III. MARCO METODOLÓGICO

3.1 Área de estudio

El estudio se realizó en cuatro centros de rescate de fauna silvestre ubicados en la región central de Costa Rica, en las provincias de Alajuela, Heredia y San José (figura 3). Los centros de rescate considerados son:

Costa Rica Animal Rescue Center, ubicado en Turrúcares de Alajuela, donde se presenta una temperatura promedio de 24.7-29°C, precipitaciones de 24-429 mm, y se encuentra a una altura media de 638 msnm (Climate Data, 2022).

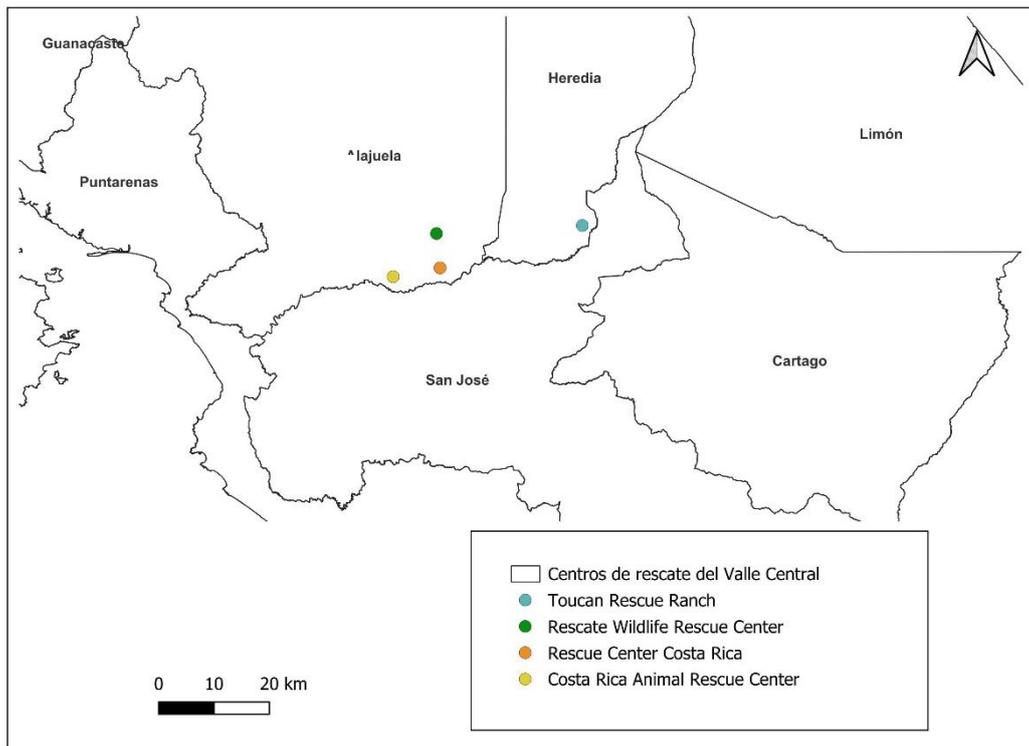
Rescate Wildlife Rescue Center, ubicado en La Garita de Alajuela, donde se presenta una temperatura promedio de 22.1°C, precipitaciones promedio de 2699 msnm y se encuentra a una altura media de 693 msnm (Climate Data, 2022).

Rescue Center Costa Rica, ubicado en La Guácima de Alajuela, donde se presenta una temperatura promedio de 22.1°C, precipitaciones de 25-447 mm, y se encuentra a una altura media de 810 msnm (Climate Data, 2022).

Toucan Rescue Ranch, ubicado en San Isidro de Heredia, donde se presenta una temperatura promedio de 19.5°C, precipitaciones anuales de 2699 mm y se encuentra a una altura media de 1360 msnm (Climate Data, 2022).

Figura 3

Mapa de ubicación de centros de rescate del Valle Central



Fuente: Elaboración propia.

3.2 Determinación de la muestra

Se realizó mediante la fórmula para la determinación de muestra de población infinita según Aguilar, (2005):

Ecuación 1

Fórmula para el cálculo de muestra de población infinita

$$n: \frac{z^2 * p * q}{d^2}$$

Donde:

n: tamaño de la muestra

z: nivel de confianza según tabla del área de la curva normal

p: proporción aproximada del fenómeno en estudio en la población de referencia

q: proporción de la población de referencia que no presenta el fenómeno en estudio (1 -p)

d: precisión absoluta

$$n: \frac{(1,96)^2 * 0,5 * 0,5}{(0,07)^2} = 196$$

A partir del resultado de “n” se decide realizar un muestreo total de 200 aves silvestres.

3.3 Recolección de muestras

Se tomaron muestras de hisopado cloacal de las aves silvestres que ingresaron y las aves residentes de los centros de rescate de vida silvestre entre el mes de enero del año 2023 hasta el mes de agosto del 2023. Las aves silvestres muertas o enfermas en vida libre fueron recolectadas por el SENASA y el SINAC para ser trasladadas al laboratorio LANASEVE donde se tomaron muestras de hisopado cloacal, traqueal y tejidos de bazo y tráquea. Las muestras recolectadas fueron identificadas y registradas en formularios del programa Microsoft Excel® que incluyen datos como: identificación del animal, etapa de vida (pichón, juvenil, adulto), orden taxonómico, especie y origen; tales datos serán recopilados primeramente en una tabla previo al muestreo (Tabla 1).

Tabla 1*Tabla de registro de aves silvestres a muestrear*

Registro de aves	
Identificación:	Sexo: Macho () Hembra () No identificado ()
Edad/Etapa de vida: () Pichón () Juvenil () Adulto () No identificado	Orden: Especie:
Lugar de procedencia:	
Resultado Anigen Rapid AIV Ag:	Positivo () Negativo ()

3.4 Prueba rápida de inmunocromatografía

Se siguió el procedimiento indicado en el kit de Anigen Rapid AIV Ag®. Cada muestra de hisopado cloacal fue sumergida en el tubo con diluyente del ensayo y se mezcló durante 10 segundos. Luego, se esperó 1 minuto para que la disolución se asentara, con la ayuda de un gotero se colocó 4 gotas del sobrenadante en el agujero que presenta el dispositivo, se verificó que el líquido fluyera y se esperó 20 minutos para leer los resultados. El resultado de la prueba se interpretó como negativo cuando se marcó únicamente la línea de control “C”, mientras que el resultado se consideró positivo cuando la línea de control “C” y la línea de prueba “T” se marcaron. La prueba se consideró como inválida cuando la línea de control “C” no se mostraba (figura 4) (Wibowo et al., 2016).

Figura 4

Interpretación de resultados de la prueba rápida de inmunocromatografía para IA



Fuente: Wibowo et al., 2016.

Esta prueba se validó a partir de una comparación con la inmunodifusión en gel de agar (IDGA), utilizando un control positivo a IA con diluciones de 1:2 hasta 1:1024. La prueba rápida de inmunocromatografía detectó la muestra positiva hasta la dilución 1:512 mientras que la IDGA resultó negativa desde la dilución 1:32 hasta la 1:1024 (Anexo 1). A partir de esto se comprobó que la prueba es más sensible a la IDGA y, por la tanto, es de uso confiable para el estudio.

3.5 Extracción de ARN

Se utilizó el kit de extracción ácidos nucleicos de patógenos IndiSpin® Pathogen kit (Qiagen, Leipzig, Alemania). La muestra de hisopado cloacal/traqueal se colocó en un tubo de almacenamiento con medio de cultivo, se centrifugó y seguidamente, con una pipeta se agregó 20 μ l de proteinasa K, 200 μ l de la muestra y 100 μ l de Buffer VXL en un tubo eppendorf, después se agitó el tubo para homogenizar la mezcla y se incubó por 15 min a 20-25 °C. Se añadió 350 μ l de Buffer ACB y se mezcló, luego se transfirió la solución a un tubo de recolección de 2 ml, se centrifugó 8000 rpm por 1 min, se transfirió el sobrenadante a otro tubo y se descartó el tubo que contenía el filtrado, se repitió este ciclo dos veces añadiendo 600 μ l de

Buffer AW1 y 600 μ l de Buffer AW2, posteriormente se centrifugó por 2 min a 14000rpm, se trasladó la solución a un eppendorf de 1.5 ml y se descartó el tubo con el filtrado, se agregó 50-150 μ l de Buffer AVE en la columna, se incubó a temperatura ambiente (15-25°C) por 1 min y, por último, se centrifugó a 14000 rpm por 1 min (INDICAL, 2020).

3.6 Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa en tiempo real (qRT-PCR)

Se utilizó el kit de One-Step RT-PCR® (Qiagen, Valencia, CA) para la amplificación y transcripción inversa de las muestras. Por cada tubo de reacción de 13 μ l se utilizó un volumen de 7 μ l de muestra extraída, 0.254 μ l de agua DEPC, 2.6 μ l de buffer One step, 0.65 μ l de $MgCl_2$, 0.416 μ l de dNTPs, 0.26 μ l de primer M+25-F, 0.52 μ l de primer InfM-124_1.1R, 0.26 μ l de primer InfM-124_1.2R, 0.52 μ l de enzima OneStep qRT-PCR, 0.26 μ l de solución ROX Dye y 0.26 μ l de sonda TaqMan M+64 (tabla 2). Luego en el termociclador (Applied Biosystems) se efectuó la retrotranscripción a una temperatura de 50 °C por 30 min, después se realizó la desactivación de la retrotranscriptasa y activación de la polimerasa a 95 °C por 15 min, por último, se realizan 40 ciclos a 94 °C por 1 s para la separación de las cadenas de ADN y 60 °C por 31 s para la unión de los primers, obteniendo un producto amplificado (Spackman et al., 2002; León et al., 2014).

Tabla 2

Primers y sondas a utilizar en el qRT-PCR para amplificación del virus de la influenza aviar

Primer/sonda	Secuencia (5'-3')
M+25	AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG
M-124	TGC AAA AAC ATC TTC AAG TCT CTG
M+64	FAM-TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA-TAMRA

Fuente: Spackman et al., 2002.

El análisis de los resultados se hizo a partir del gráfico que muestra una curva de amplificación en tres fases: fase exponencial, fase lineal y fase meseta. En la primera fase hay un aumento exponencial de la amplificación, luego en la fase lineal la amplificación empieza a disminuir y, por último, se alcanza la fase meseta donde la amplificación es reducida al mínimo. La curva de amplificación se forma a través de la detección de señal de fluorescencia en cada ciclo producido; a partir de una línea base la cual hace referencia a la fluorescencia que se define en el ciclo inicial, se localiza el umbral justo encima de esta y se determina el umbral de ciclos (Ct) que es el punto en que la fluorescencia sobrepasa el umbral (Bustin & Mueller, 2005; Yuan et al., 2006; Nassiri et al., 2018). Para un valor de Ct ≤ 35.0 la muestra se consideró positiva, mientras que para el valor de Ct > 35.0 se consideró sospechosa y se repitió la prueba, en los casos con un Ct indetectable, la muestra se consideró negativa (León et al., 2014).

3.6 Análisis estadístico de datos

Se realizó un análisis estadístico de asociación de variables cualitativas nominales por la prueba de Chi cuadrada en el programa R, en donde se planteó una

hipótesis nula (H_0) y una hipótesis alterna (H_a) para cada variable (origen, orden taxonómico, especie), de las cuales se estableció que las variables eran independientes o estaban asociadas a la presencia de la enfermedad respectivamente. Si el valor de p fue $<0,05$ se rechazó la hipótesis nula mientras que si el resultado fue $>0,05$ se aceptó.

Hipótesis para la variable origen:

- H_0 : variable de origen es independiente a la presencia de la enfermedad
- H_a : variable de origen está asociada a la presencia de la enfermedad

Hipótesis para la variable orden taxonómico:

- H_0 : variable de orden taxonómico es independiente a la presencia de la enfermedad
- H_a : variable de orden taxonómico está asociada a la presencia de la enfermedad

Hipótesis para la variable especie:

- H_0 : variable de especie es independiente a la presencia de la enfermedad
- H_a : variable de especie está asociada a la presencia de la enfermedad

Se implementó un modelo lineal generalizado (GLM) para evaluar si existen diferencias significativas en la proporción de casos positivos y sus intervalos de confianza (IC) al 95% a través del programa R, en donde si los IC no se interponen con respecto al valor 1, se estable que hay una diferencia significativa.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Aves silvestres en centros de rescate

Se obtuvieron 200 muestras de hisopado cloacal en cuatro centros de rescate de vida silvestre del Valle Central, 10 de Costa Rica Animal Rescue Center, 47 de Rescue Center Costa Rica, 61 de Rescate Wildlife Rescue Center y 82 de Toucan Rescue Ranch. Se registraron 51 especies de aves que pertenecen a 12 órdenes taxonómicos, en un 2% accipitriformes, 8% anseriformes, 2% caprimulgiformes, 4.5% columbiformes, 0.5% coraciiformes, 1.5% falconiformes, 0.5% galliformes, 19% passeriformes, 15.5% piciformes, 0.5% podicipediformes, 32% psittaciformes, 14% strigiformes. No se detectó ningún resultado positivo a la prueba rápida de inmunocromatografía para detección de influenza aviar (tabla 3).

Tabla 3

Resultados de las muestras a la prueba rápida de inmunocromatografía para detección del virus de la influenza aviar en aves silvestres localizadas en centros de rescate del valle central

Orden	Especie	N° de muestras	Resultado Anigen Rapid AIV Ag
Accipitriformes	<i>Buteo brachyurus</i>	1	Negativo
	<i>Buteo magnirostris</i>	1	Negativo
	<i>Buteo nitidus</i>	1	Negativo
	<i>Harpagus bidentatus</i>	1	Negativo
Anseriformes	<i>Aythya affinis</i>	8	Negativo
	<i>Dendrocygna bicolor</i>	3	Negativo
	<i>Sapatula discors</i>	4	Negativo
	No ID	1	Negativo
Caprimulgiforme	<i>Nyctibius grandis</i>	2	Negativo
	<i>Nyctidromus albicollis</i>	2	Negativo
Columbiformes	<i>Columba livia</i>	4	Negativo
	<i>Zenaida asisatica</i>	5	Negativo
Coraciiformes	<i>Momotus bahamensis</i>	1	Negativo
Falconiformes	<i>Caracara plancus</i>	1	Negativo

	<i>Falco hypoleucos</i>	1	Negativo
	<i>Falco rufigularis</i>	1	Negativo
Galliformes	<i>Ortalis cinereiceps</i>	1	Negativo
Passeriformes	<i>Campylorhynchus rufinucha</i>	1	Negativo
	<i>Euphonia luteicapilla</i>	1	Negativo
	<i>Hirundo rustica</i>	1	Negativo
	<i>Icterus pustulatus</i>	1	Negativo
	<i>Myadestes melanops</i>	10	Negativo
	<i>Pitangus sulphuratus</i>	3	Negativo
	<i>Psarocolius montezuma</i>	2	Negativo
	<i>Quiscalus mexicanus</i>	5	Negativo
	<i>Sporophila corvina</i>	1	Negativo
	<i>Sporophila morelleti</i>	1	Negativo
	<i>Tachycineta albilinea</i>	4	Negativo
	<i>Troglodytes aedon</i>	1	Negativo
	<i>Turdus grayi</i>	1	Negativo
	<i>Tyrannus melancholicus</i>	6	Negativo
Piciformes	<i>Aulacorhynchus prasinus</i>	2	Negativo
	<i>Pteroglossus frantzii</i>	4	Negativo
	<i>Pteroglossus torquatus</i>	4	Negativo
	<i>Ramphastos Ambiguus</i>	15	Negativo
	<i>Ramphastos Sulfuratus</i>	6	Negativo
Podicipediformes	<i>Tachybaptus dominicus</i>	1	Negativo
Psittaciformes	<i>Amazona albifrons</i>	3	Negativo
	<i>Amazona Auropalliata</i>	16	Negativo
	<i>Amazona autumnalis</i>	22	Negativo
	<i>Amazona farinosa</i>	1	Negativo
	<i>Ara macao</i>	8	Negativo
	<i>Pionus menstruus</i>	1	Negativo
	<i>Pionus senilis</i>	1	Negativo
	<i>Psittacara finschi</i>	11	Negativo
	<i>Psittacara holochlorus</i>	1	Negativo
Strigiformes	<i>Asio clamator</i>	3	Negativo
	<i>Ciccaba virgata</i>	6	Negativo
	<i>Glaucidium brasilianun</i>	1	Negativo
	<i>Megascops choliba</i>	7	Negativo
	<i>Pulsatrix perspicillata</i>	8	Negativo
	<i>Strix nigrolineata</i>	3	Negativo
		200	

En este estudio se analizaron algunos de los órdenes taxonómicos de aves silvestres clasificados como susceptibles a portar o contraer el virus de la influenza aviar, como los anseriformes, passeriformes, strigiformes, accipritiformes y galliformes (OIE, 2021).

Además, se encontraron especies en las que se han reportado casos positivos a IA en otros países en aves silvestres de vida libre como en *Aythya affinis*, *Dendrocygna bicolor*, *Sapatula discors* en Guatemala (Méndez et al., 2021) o *Caracara plancus* y *Quiscalus mexicanus* en Estados Unidos (CDC, 2023).

Los resultados de esta investigación se asemejan a los estudios realizados en el Centro de Rescate de Vida Silvestre de ARCAS y en el Parque Zoológico Minerva, ambos ubicados en Guatemala, donde se muestrearon aves del orden falconiformes, strigiformes, accipitriformes y psitaciformes, siendo el 100% de los resultados negativos, en estos casos para detección de anticuerpos por la prueba de inhibición de la hemoaglutinación (Lara, 2008; Neu, 2016).

A partir de este estudio se puede determinar que no hay presencia del virus de IA a la prueba rápida de inmunocromatografía, sin embargo, no se puede asegurar que no existe prevalencia del virus, puesto que esta no es la prueba de oro. La sensibilidad de esta prueba es baja con respecto al RT-PCR, el kit de Anigen Rapid AIV Ag® indica que la sensibilidad de esta prueba en patos es de 77.3% y especificidad es del 100%, mas no se ha reportado valores para otras especies de aves silvestres (BIONOTE, 2021), para la prueba molecular RT-PCR se estima una sensibilidad de 93.3% y una especificidad del 98.4% (Cattoli, 2004). La mayoría de las aves que llegan a los centros de rescate es por caídas del nido, decomisos y encontrados sin capacidad para volar generalmente por fracturas; en este muestreo solo hubo un ave del orden anseriformes que presentaba signos compatibles al virus de IA, la cual resulto negativa a la prueba qRT-PCR, el resto de las aves la mayoría eran residentes sanos, por lo que hay una alta probabilidad de que verdaderamente hayan estado negativos o bien que portaban una carga viral reducida que hubiera limitado que la prueba rápida de inmunocromatografía lo detecte (BIONOTE, 2021)

La ausencia de aves positivas en los sitios de manejo de vida silvestre del Valle Central pudo estar relacionado a que los protocolos de bioseguridad se reforzaron tras la alerta epidemiológica ante brotes de influenza aviar en países latinoamericanos durante el 2022 y 2023 (OPS, 2023), algunos de los centros restringieron el ingreso de posibles aves reservorios como los anseriformes, por lo que la probabilidad de propagación de enfermedad era menor.

Todos los centros de rescate contaban con su respectiva área de cuarentena, el personal se encontraba pendiente de cambios comportamentales o desarrollo de signos clínicos en las aves manejadas del sitio, se mantenían los procedimientos de limpieza y desinfección de jaulas, limpieza de comederos y bebederos que pueden ser fuentes de contaminación en caso de contacto con heces de un ave infectada (SENASA, 2023).

Además, la ubicación de los centros pudo influir con respecto a que no hay zonas costeras cerca por lo que la presencia de aves acuáticas es menor (Alvarado, 2006), influyendo en menor contacto de aves silvestres de vida libre con aves de cautiverio y en el ingreso de aves acuáticas, dado que la mayoría de las aves que se reciben en estos centros son aves del Valle Central.

Es importante que las aves que vayan a ser liberadas se evalúen y se declaren totalmente libre de enfermedad, dado que, en caso de que alguna de estas aves sea positiva, se aumenta el riesgo de diseminación de enfermedad (González, 2017). Las aves residentes de los centros de rescate generalmente no pueden ser liberadas porque no se consideran aptas para sobrevivir en vida libre, por lo que el hecho de estar en un recinto disminuye el contacto con otras aves silvestres, sin embargo, no se pueden considerar exentas; principalmente las aves juveniles que son más

susceptibles por presentar un sistema inmune inmaduro (Villavivencio, 2018; Gómez, 2022).

4.2 Aves silvestres reportadas

Se reportó un total de 59 aves silvestres al SENASA entre los meses de enero y agosto del año 2023, 45 (76.27%) por manifestación de signos clínicos compatibles a la influenza aviar y 14 (23.73%) encontradas muertas. Se categorizaron 12 órdenes taxonómicos y 20 especies de aves, el 32.20% de las muestras pertenecen al orden pelecaniformes. Mediante la técnica de qRT-PCR se detectó un 25.42% de aves positivas siendo el 22.03% *Pelecanus occidentalis* y el 3.39% *Falco peregrinus* (tabla 4).

Tabla 4

Resultados de las muestras a la prueba de qRT-PCR y prueba Anigen Rapid AIV Ag para detección del virus de la influenza aviar en aves silvestres reportadas al SENASA según orden taxonómico y especie

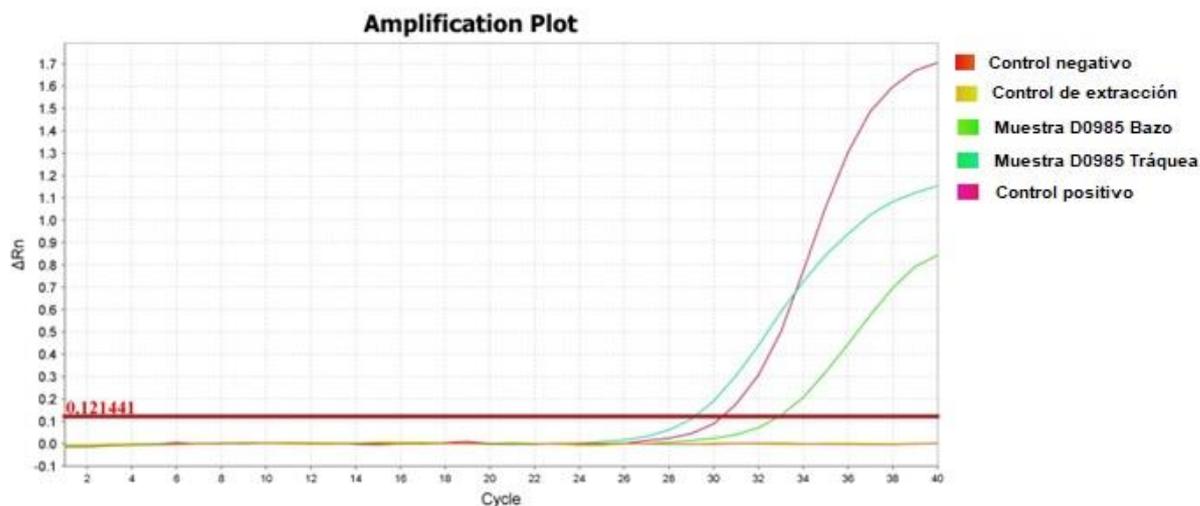
Orden	Especie	N° de muestras	N° de positivos a qRT-PCR	N° de positivos a Anigen Rapid AIV Ag
Accipitriformes	<i>Accipiter nisus</i>	1	0	-
Anseriformes	<i>No ID</i>	7	0	-
	<i>Dendrocygna autumnalis</i>	1	0	-
Cathartiformes	<i>Coragyps atratus</i>	2	0	-
Columbiformes	<i>Columbia livia</i>	8	0	-
Coraciiformes	<i>Momotus lessonii</i>	1	0	-
Falconiformes	<i>Caracara cheriway</i>	1	0	-
	<i>Falco peregrinus</i>	4	2	2
	<i>Crax rubra</i>	1	0	-
Galliformes	<i>Meleagris gallopavo</i>	2	0	-

	<i>Penelope purpurascens</i>	1	0	-
Passeriformes	<i>Quiscalus mexicanus</i>	4	0	-
	<i>Zonotrichia capensis</i>	2	0	-
Pelecaniformes	<i>Pelecanus occidentalis</i>	18	13	13
	<i>Tigrisoma mexicanum</i>	1	0	-
Piciformes	<i>Melanerpes pucherani</i>	1	0	-
	<i>Ramphastos ambiguus</i>	1	0	-
Strigiformes	<i>Ciccaba virgata</i>	1	0	-
Suliformes	<i>Fregata magnificens</i>	1	0	-
	<i>Sula nebouxii</i>	1	0	-
		59	15	15

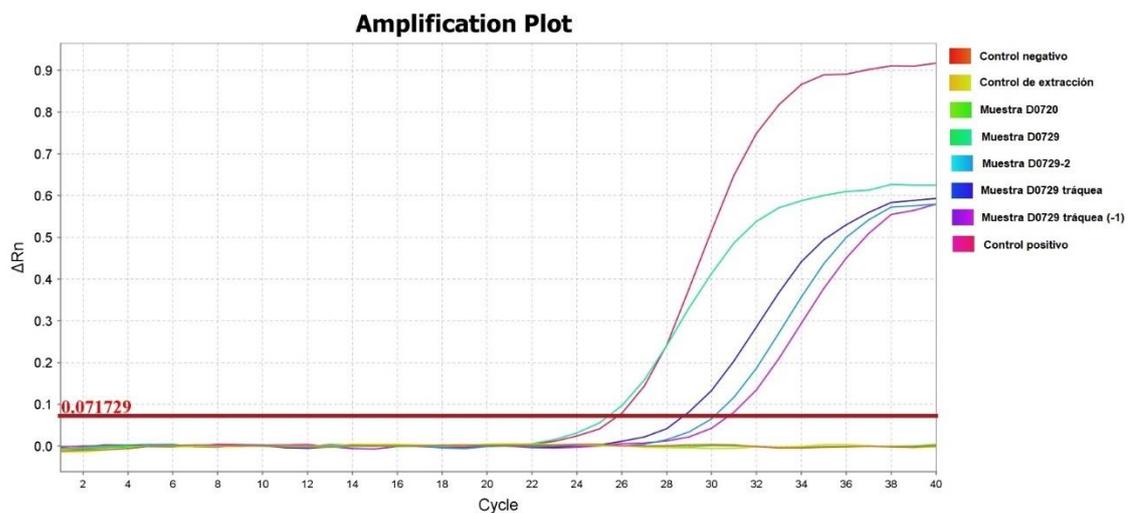
En el análisis del qRT-PCR de una de las muestras positivas a influenza aviar para la especie *Pelecanus occidentalis* se observó una fluorescencia por encima del umbral a partir del ciclo 28 para la muestra de tejido traqueal y por encima de 32 para la muestra de tejido de bazo (figura 5), mientras que para la especie *Falco peregrinus* se observó el umbral de ciclos por encima de 24 para los hisopados cloacales y por encima de 26 para el tejido traqueal (figura 6).

Figura 5

Resultado positivo de la prueba qRT-PCR de la especie *Pelecanus occidentalis*

**Figura 6**

Resultado positivo de la prueba qRT-PCR de la especie *Falco peregrinus*



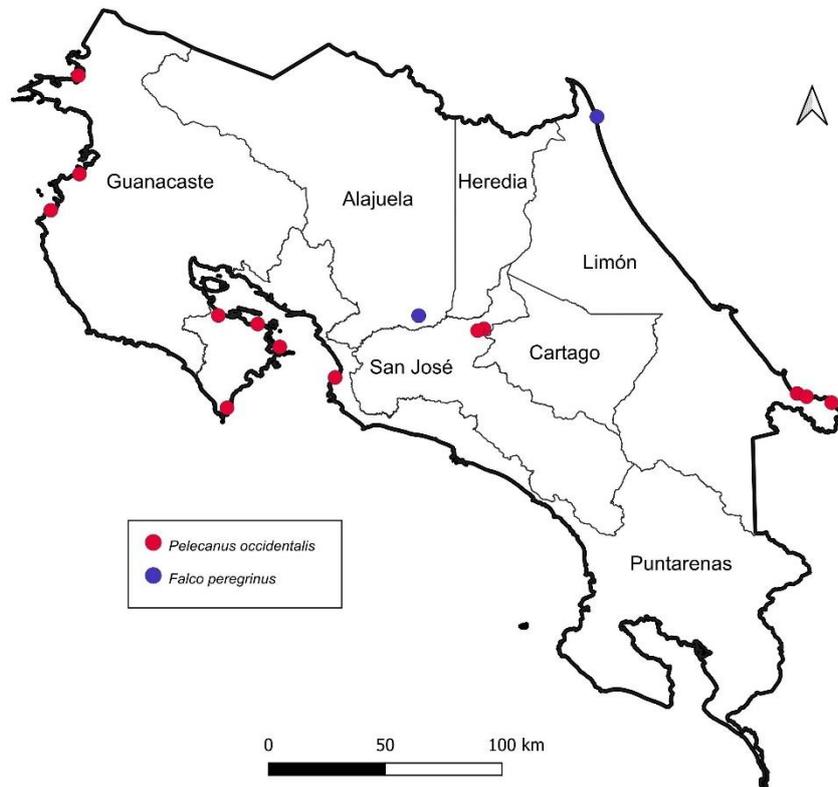
Los resultados positivos a la prueba de qRT-PCR concuerdan con los resultados de la prueba rápida de inmunocromatografía. La especie *Pelecanus occidentalis* se reportó en distintas zonas del país incluyendo la Región Central, Chorotega, Huetar Atlántica y Pacífico Central, mientras que la especie *Falco peregrinus* se reportó en la Región Central y Huetar Atlántica (tabla 5) (figura 6).

Tabla 5*Registro de muestras positivas al virus de la influenza aviar según especie y origen*

Especie	Región	Provincia	Cantón	Distrito	ID	N° de positivos qRT-PCR	
<i>Pelecanus occidentalis</i>	Central	San José	Moravia	San Vicente	D2720	1	
			San José	San Sebastián	D2859	1	
	Chorotega	Guanacaste	Carrillo	Sardinal	D0618	1	
			Santa Cruz	Cabo Velas	D0715	1	
			La Cruz	Santa Elena	D0985	1	
	Huetar Atlántica	Limón	Talamancas	Cahuita	D0177	3	
					D0367		
	Pacífico Central	Puntarenas	Puntarenas	Garabito	Cobano	D0278	1
					Lepanto	D0428	2
					Paquera	D0716	1
Tárcoles					D0427	1	
Alajuela					D0529	1	
<i>Falco peregrinus</i>	Central	Alajuela	Alajuela	Garita	D0729	1	
	Huetar Atlántica	Limón	Pococí	Colorado	D0377	1	
						15	

Figura 7

Localización de casos positivos a influenza aviar en Costa Rica según especie



Fuente: Elaboración propia.

Para el análisis estadístico Chi cuadrado se categorizaron la cantidad de aves positivas y negativas que se detectaron a la prueba de rRT-PCR según la variable de orden taxonómico, especie y origen (región donde se encontró el ave), para evaluar si existe una dependencia entre la presencia de la enfermedad y las variables. Todos los resultados para el valor de p fueron <0.05 lo que indica que existe una diferencia significativa entre el número de casos positivos en cada tipo de variable, por lo que se rechaza la hipótesis nula (tabla 6).

Tabla 6

Resultados del análisis estadístico Chi cuadrado (χ^2) en variables de orden, especie y origen con respecto a la presencia del virus de la influenza aviar en aves silvestres

Variables	Valor P
Orden- Enfermedad	0.0011
Especie- Enfermedad	0.0306
Origen- Enfermedad	0.005379

Para la primera variable se conoce que hay 12 órdenes taxonómicos, de los cuales el orden pelecaniformes obtiene el 86.67% del total de aves positivas y que, de 19 aves muestreadas de este orden, un 68.42% fueron positivas, lo que refleja una proporción significativamente mayor en comparación con los otros órdenes del estudio, deduciendo una relación entre la enfermedad y el orden. Para la segunda variable se registraron 20 especies diferentes donde de igual forma el 86.67% del total de aves positivas corresponden a la especie *Pelecanus occidentalis*. La asociación del virus de la influenza aviar con este orden taxonómico y especie es un resultado esperado, dado que forman parte del grupo de aves acuáticas reportadas como reservorios (Nikolov, 2020; Valles, 2023), aunque generalmente portan el virus de baja patogenicidad, la respuesta inmune humoral y adquirida es baja, por lo que en ocasiones al presentar cepas de alta patogenicidad, provoca enfermedad y muerte (Wallesten 2006; Valles, 2023) como sucedió en estos casos.

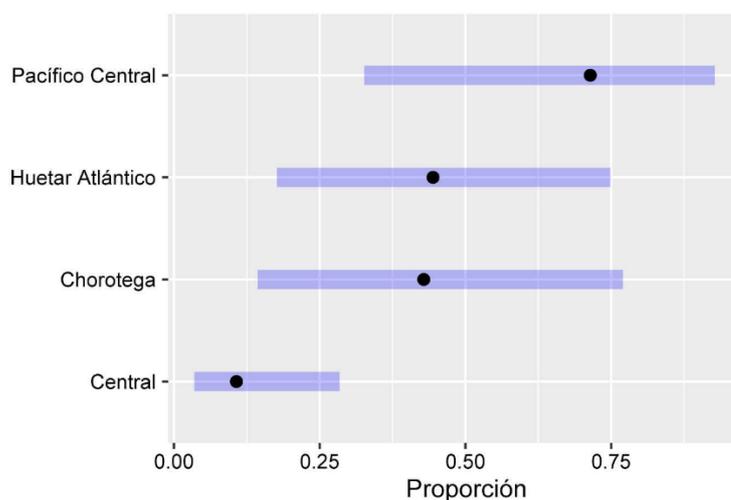
Para la variable de origen también se observó una asociación con la enfermedad de IA, se presentan un 33.33% de aves positivas en el pacífico central, 26.67% en la región Huetar atlántica y 20% en la región Chorotega y Central. La mayoría de los casos positivos en la región Pacífico central y Huetar Atlántico puede estar relacionado a que la especie *Pelicanus occidentalis* reside de forma permanente

en la Reserva Natural Absoluta Cabo Blanco, ubicada en la Península de Nicoya, y también pueden encontrarse en toda la costa del pacífico y del atlántico (Fresnillo & Cruz, 2004), además que se encuentra la ruta migratoria del Pacífico, la cual convierte a esta población susceptible en caso de brotes en otros países de América. En la región Central el hallazgo de casos en la especie *Falco peregrinus* podría parecer extraordinario dado que por lo general el halcón peregrino tiene afinidad por zonas costeras, islas y humedales, no obstante, es común que parte de la población permanezca en áreas urbanas por motivos alimenticios, ya que en estas hay una gran cantidad de palomas castilla (*Columba livia*), que son presas de esta ave (Vargas & Ramírez, 2012). Para el caso de los pelicanos pardo en esta región, no hay una relación de necesidad para permanecer en esta zona, por lo que se asume que pudieron haber sido trasladados por personas, a diferencia de los casos en el Huetar Atlántico que se conoce que habitan por cercanía a la costa y humedales.

Por medio de un análisis modelo lineal generalizado (GLM), se determinó la proporción de casos positivos por región según cantidad de muestras más su intervalo de confianza al 95%, donde la región Central obtiene un valor de 0.11, Huetar Atlántica de 0.44, Chorotega de 0.42 y Pacífico Central de 0.71 destacándose como la más alta (Figura 8). Esto evidenció que existen diferencias significativas en la proporción de casos positivos entre las regiones Pacífico Central y Central. A partir de esto se puede determinar que las regiones con casos positivos sin diferencias significativas tienen en común que se encuentran en zonas costeras por lo que es más probable que se encuentren aves acuáticas reservorios del virus de IA (Valles, 2023).

Figura 8

Proporción de casos positivos entre las regiones de Costa Rica, mostrando un intervalo de confianza del 95%



Consecuente a la detección de casos positivos de IA, se realiza un muestreo en 47 aves silvestres de la región Huetar Atlántica y Central como protocolo de vigilancia activa por previo foco de influenza aviar, se presentan 8 órdenes taxonómicos y 17 especies sin manifestación de signos clínicos. No se detecta ninguna muestra positiva a la prueba de qRT-PCR (tabla 7). Estos resultados pueden ser porque los focos de influenza en el país se controlaron de forma inmediata evitando una diseminación del virus a otras poblaciones de aves cercanas a las zonas infectadas. El Plan de Emergencia de Influenza Aviar, declara que las zonas afectadas deben cumplir con una cuarentena inmediata mínima de 21 días al detectar un caso positivo, hasta que se tome el control del brote, también se prohíbe el movimiento de aves, y sus productos en el caso de aves de corral o traspatio; para las zonas sospechosas (áreas dentro de los 3km cercanos a la zona infectada) se determina una cuarentena de mínimo 72 horas hasta descartar la presencia del virus, los movimientos se restringen y se inician muestreos de vigilancia diarios; para la zona de protección (5 km cercanos a la zona bajo control), se establece un cuarentena de

precaución de al menos 72 horas, se controlan los movimientos de aves y se realizan vigilancias semanales; para la zona determinada como libre, se mantiene la vigilancia epidemiológica de rutina y los protocolos de bioseguridad (Chaves, 2023).

Tabla 7

Resultados de las muestras a la prueba de qRT-PCR para detección del virus de la influenza aviar en aves silvestres en vigilancia activa por el SENASA según orden taxonómico y especie

Orden	Especie	N° de muestras	Resultado a qRT-PCR
Anseriformes	No ID	1	Negativo
Columbiformes	Patagioenas flavirostris	1	Negativo
Galliformes	Ortalis cinereiceps	4	Negativo
Passeriformes	Psarocolius montezuma	4	Negativo
	Quiscalus mexicanus	2	Negativo
Piciformes	Ramphastos sulfuratus	1	Negativo
Psittaciformes	Agapornis spp	1	Negativo
	Amazona auropalliata	2	Negativo
	Amazona autumnalis	9	Negativo
	Nymphicus hollandicus	1	Negativo
	Platycercus spp	1	Negativo
	Psittacula krameri	1	Negativo
Strigiformes	Asio clamator	2	Negativo
	Ciccaba virgata	1	Negativo
	Lophostrix cristata	1	Negativo
	Pulsatrix perspicillata	6	Negativo
	No ID	5	Negativo
Suliformes	Sula leucogaster	4	Negativo
		47	

La cantidad de aves silvestres positivas al virus de la influenza aviar que se presentan en el país (13 *Pelecanus occidentalis* y 2 *Falco peregrinus*), son similares

a las reportadas en otros países de Centroamérica durante el año 2023 como Guatemala y Panamá donde se reportan 11 y 12 casos respectivamente en la especie *Pelecanus occidentalis* (WAHIS, 2023), pero difieren de los brotes en Honduras donde se presentan 123 casos, Brasil 72 casos que registran especies como *Thalasseus acutiflavus* y *Sula leucogaster*, Uruguay 100 casos de la especie *Cygnus melancoryphus*, y más de 55,000 casos en Perú donde se registra la especie *Pelecanus thagus*. Estos focos de IAAP tienen relación con las rutas migratorias de las aves, que van de Norteamérica a Suramérica dado que en el 2022 se inició un brote en los Estados Unidos y Canadá donde se reportan hasta el momento 7212 y 2243 aves silvestres positivas respectivamente (CDC, 2023; CWHC, 2023). Además, los meses en los que se reportaron el 80% de los casos (enero-febrero), coinciden con el patrón histórico de estacionalidad de la IAAP donde la diseminación da inicio en setiembre, aumenta en octubre y llega al máximo en febrero (OPS, 2023).

Con respecto a las regiones donde se localizaron los casos positivos (Región central, Chorotega, Huetar Atlántica y Pacífico Central), se encontró un mayor porcentaje (33,33%) de casos en la región Pacífico Central lo cual concuerda con la ruta migratoria del Pacífico que es en donde se reportaron más focos de IAAP en América (OPS, 2023). Además, estos casos se asocian a los sitios para invernar o de parada que frecuenta la población de aves acuáticas en Costa Rica, como lo es la costa del atlántico y pacífico, en estas se encuentran manglares, playas y pantanos actuando como sitios de alimentación para diversas aves, convirtiéndose en lugares susceptibles de diseminación viral (Alvarado, 2006).

La ausencia del virus de IA en aves del orden anseriformes en este estudio pudo estar relacionado a que la respuesta inmune de algunas especies de la familia

Anatidae permite que la replicación viral se limite, por lo que se genera una resistencia a este virus (Evseev & Magor, 2019).

Los signos clínicos que se presentaron en las aves enfermas fueron principalmente neurológicos incluyendo ataxia, movimientos de cabeza, incapacidad para volar, incapacidad de mantenerse en pie y sostener la cabeza, postración, comportamiento errático (no huyen), también se identificaron otros signos como disnea, estertores, deshidratación, plumaje erizado, depresión, baja condición corporal y debilidad. La aparición de signos clínicos varía según la cepa que afecta el ave, así como también la especie a la que pertenece el hospedador (García, 2022). Es importante que la población en general conozca los signos clínicos de esta enfermedad para ser capaz de identificar casos y reportarlos de forma inmediata, así como saber que no se debe tener contacto ni manipular un ave que presenta estos signos, por efecto de zoonosis (SENASA, 2023).

V. CONCLUSIONES

No se estima una prevalencia del virus de la influenza aviar en centros de rescate de vida silvestre del Valle Central entre los meses de enero y agosto del año 2023, según resultados de la prueba rápida de inmunocromatografía para detección de antígeno.

Se reportan los primeros 15 casos de influenza aviar en Costa Rica correspondientes a aves silvestres en vida libre, 13 de la especie *Pelecanus occidentalis* y 2 *Falco peregrinus* distribuidos en 12 distritos y 4 regiones del país (Huetar Atlántica, Chrottega, Central y Pacífico Central).

Se determina una relación entre la presencia de la enfermedad, el orden taxonómico y la especie de las aves silvestres, con afinidad hacia el orden pelecaniformes, especie *Pelecanus occidentalis*, además de una relación con el origen, siendo la región Pacífico Central con más casos reportados (33.33%).

No se detectan casos positivos al protocolo de vigilancia activa posterior a los focos de influenza aviar.

VI. RECOMENDACIONES

Para evitar el surgimiento de nuevos brotes de IA en el territorio costarricense es importante que se siga el Protocolo de Influenza Aviar de Alta Patogenicidad en Fauna Silvestre que plantea el SENASA, el cual indica a la población que, ante el hallazgo de un caso sospechoso a IA (ave muerta o con signos compatibles a la enfermedad), se debe notificar de forma inmediata a autoridades como el SINAC o el SENASA, no se debe tener contacto, ni trasladar el ave a un centro de rescate u hospital veterinario (SENASA, 2023).

Para los sitios de manejo de fauna silvestre (SMFS), es importante que se sigan los protocolos de bioseguridad, se cuente con un área de cuarentena para los animales que ingresen, se reporte al médico veterinario si algún ave sufre un cambio en su comportamiento y se debe procurar que los recintos no permitan el contacto con aves silvestres de vida libre. En caso de detectar un caso positivo, el animal se debe aislar o someter a eutanasia, mientras que el resto de la colección se mantiene en cuarentena y se establece un muestreo; además se caracterizan zonas cercanas susceptibles y se implementa un protocolo de vigilancia (SENASA, 2023).

Con respecto al control de zoonosis, el personal a cargo de muestrear los casos sospechosos debe hacer uso de equipo de protección como guantes, mascarilla, ropa exclusiva para manipular las aves y protección para los ojos. Para los SMFS donde se haya detectado un caso positivo, se debe restringir el acceso al público por un periodo determinado por el SENASA, no se debe permitir la salida o ingreso de aves y el personal debe cumplir con las medidas de higiene (SENASA, 2023).

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, S. (2005). Fórmulas para el cálculo de la muestra en investigaciones de salud. *Revista salud en Tabasco*, 11(1-2), 333-338. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=48711206>
- Alcántara, T. (2019). *Influenza aviar*. (Tesis de grado). Universidad Nacional San Luis Gonzaga
- Alvarado, G. (2006). *Aves acuáticas y humedales de Costa Rica: Estado de conservación*. Editorial San José, Museo Nacional de Costa Rica.
- Alvarado, R. (2003). *Regiones y cantones de Costa Rica*. Costa Rica: San José. Instituto de Fomento y Asesoría Municipal.
- Anis, A., AboElkhair, M., & Ibrahim, M. (2018). Characterization of highly pathogenic avian influenza H5N8 virus from Egyptian domestic waterfowl in 2017. *Avian pathology*, 47(4), 400-409. <https://doi.org/10.1080/03079457.2018.1470606>
- Blagodatski, A., Trutneva, K., Glazova, O., Mityaeva, O., Shevkova, L., Kegeles, E., & Volchkov, P. (2021). Avian influenza in wild birds and poultry: Dissemination pathways, monitoring methods, and virus ecology. *Pathogens*, 10(5), 630. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050630>
- Buscaglia, C. (2004). Influenza aviar. *Revista Invet*, 6(1), 1-20.
- Bustin, S., & Mueller, R. (2005). Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clinical Science*, 109(4), 365-379. <https://doi.org/10.1042/CS20050086>
- Cattoli, G., Drago, A., Maniero, S., Toffan, A., Bertoli, E., Fassina, S., Terregino, C., Robbi, C., Vicenzoni, G., Capua, I. (2004). Comparison of three rapid detection systems for type A influenza virus on tracheal swabs of

experimentally and naturally infected birds. *Avian Pathology*, 33(4), 432–437.

<https://doi.org/10.1080/03079450410001724058>

Canadian Wildlife Health Cooperative. (2023) *High pathogenicity avian influenza in wildlife*.

Centers for Disease Control and Prevention. (2023). *H5N1 Bird Flu: Current Situation Summary*.

CFSPH. (2010). *Influenza aviar de alta patogenicidad*. The center for food security and public health. Iowa State University. Estados Unidos.

Chan, P. (2002). Outbreak of avian influenza A (H5N1) virus infection in Hong Kong in 1997. *Clinical Infectious Diseases*, 34(2), 58-64.
<https://doi.org/10.1086/338820>

Chaves, R. (2023). *Plan de Emergencia de Influenza Aviar*. SENASA. Costa Rica.

Climate Data. (2022). *Datos y gráficos de tiempo y clima en Costa Rica*. Climate-Data.org. <https://en.climate-data.org/north-america/costa-rica-43/>

David, M. (2016). Highly pathogenic avian influenza: challenges encountered and measures for preventing its spread. Organisation for Animal Health: Paris, France, 2016, 1-11.

Evseev, D., & Magor, K. E. (2019). Innate immune responses to avian influenza viruses in ducks and chickens. *Veterinary sciences*, 6(1), 5

Ferrer, M. E., López, E. J., Chuard, N. S., Ramos, M., Ciano, S., Pinto, R. L. O., & Pidcova, V. J. P. R. (2023). Panorama sobre Influenza Aviar Altamente Patógena H5N1 en Argentina, incluyendo el contexto en las Américas y el mundo. *SNS*, 2(11).

Fresnillo, M., & Cruz, P. *Censo de pelícanos pardos de la Reserva Natural Absoluta Cabo Blanco*. Universidad de Costa Rica.

- Fujimoto, Y., Usui, T., Ito, H., Ono, E., & Ito, T. (2015). Susceptibility of wild passerines to subtype H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses. *Avian Pathology*, 44(4), 243-247. <https://doi.org/10.1080/03079457.2015.1043235>
- García, C. (2022). *Monitoreo de Influenza Aviar*. (Tesis de grado). Universidad Nacional San Luis Gonzaga de Ica.
- Garrigues, R., Varela, P. C., Montoya, M., O'Donnell, P., Ramírez, Ó., & Zook, J. (2022). Lista Oficial de las Aves de Costa Rica – Actualización 2022. Comité de Especies Raras y Registros Ornitológicos de Costa Rica (Comité Científico), Asociación Ornitológica de Costa Rica.
- Goekjian, V., Smith, J., Howell, D., Senne, D., Swayne, D., & Stallknecht, E. (2011). Avian influenza viruses and avian paramyxoviruses in wintering and breeding waterfowl populations in North Carolina, USA. *Journal of wildlife diseases*, 47(1), 240-245. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-47.1.240>
- Gómez, S. *Evaluación del efecto del enriquecimiento ambiental en el comportamiento de dos especies de psitácidos (Amazona sp. y Ara sp.) y tres especies de felinos (Leopardus pardalis, Panthera tigris y Puma concolor) en estado de cautiverio del Zoológico Jaime Duque*. Tesis de grado. Bogotá.
- González, A., Müller, M., Ortiz, L., Cerdón, C., & Perez, D. (2016). Prevalence and diversity of low pathogenicity avian influenza viruses in wild birds in Guatemala, 2010–2013. *Avian diseases*, 60(1), 359-364. <https://doi.org/10.1637/11130-050715-Reg>
- González, S. (2017). *Determinación de la relación entre prevalencia de virus influenza aviar y estacionalidad de las comunidades de aves silvestres en los sectores Humedal Laguna Cartagena y Reserva Nacional Lago Peñuelas*. Tesis de grado.

- Hernández, S., Villegas, P., Jiménez, C., Hernández, S, García, M., Riblet, S., & Sánchez, S. (2008). Backyard chicken flocks pose a disease risk for neotropical birds in Costa Rica. *Avian Diseases*, 52(4), 558-566. <https://doi.org/10.1637/8298-032808-Reg.1>
- Hill, N. J., Bishop, M. A., Trovão, N. S., Ineson, K. M., Schaefer, A. L., Puryear, W. B., ... & Runstadler, J. A. (2022). Ecological divergence of wild birds drives avian influenza spillover and global spread. *PLOS Pathogens*, 18(5), e1010062.
- Kurmi, B., Murugkar, H. V., Nagarajan, S., Tosh, C., Dubey, S. C., & Kumar, M. (2013). Survivability of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus in poultry faeces at different temperatures. *Indian Journal of Virology*, 24(2), 272-277.
- Kwon, J., Lee, D., Swayne, D., Noh, J., Yuk, S., Erdene, T., & Song, C. (2016). Highly pathogenic avian influenza A (H5N8) viruses reintroduced into South Korea by migratory waterfowl, 2014–2015. *Emerging infectious diseases*, 22(3), 507. <https://doi.org/10.3201/eid2203.151006>
- Lara, D. (2008). *Determinación de anticuerpos circulantes contra el virus de influenza aviar en aves del Centro de Rehabilitación de Vida Silvestre ARCAS, Flores, Petén, Guatemala* (Tesis de grado, Universidad de San Carlos de Guatemala).
- León, B., Chaves, G., Koster, L., Jenkins-Moore, M., Carrillo, C., & Méndez, D. (2014). Isolation and identification of pandemic influenza virus H1N1/2009 S-OIV from commercial and backyard swine in Costa Rica. *Revista de Ciencias Veterinarias*, 29(2), 57-85.
- Marín, P., Rodríguez, E., Espinoza, A., & Pablo, J. (2018). Primer registro de *Spatula discors* (Anseriformes: Anatidae) en laguna principal del Parque Nacional Braulio Carrillo, Sector Volcán Barva. *Zeledonia*, 22 (1), 93-95.

- Mathieu, C., Moreno, V., Pedersen, J., Jeria, J., Agredo, M., Gutiérrez, C., & Retamal, 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>
- Méndez, D., Morán, D., Ortiz, L., Serrano, C., Morales-Betoulle, M. E., Álvarez, D., & Córdón, C. (2021). 13 años de monitoreo de Influenza aviar en aves acuáticas migratorias en la Costa Sur de Guatemala. *Revista 42 de la Universidad del Valle de Guatemala*, 20-27.
- Nassiri, M., Elahi Torshizi, M., Ghovvati, S., & Doosti, M. (2018). Evaluation of different statistical methods using SAS software: an in-silico approach for analysis of real-time PCR data. *Journal of Applied Statistics*, 45(2), 306-319.
- Neu, A. (2016). *Determinación de anticuerpos circulantes contra el virus de influenza aviar en aves del parque Zoológico Minerva de Quetzaltenango, Guatemala* (Tesis de grado, Universidad de San Carlos de Guatemala).
- Nikolov, S., Marinova, H., Murad, B., & Tsachev, I. (2020). A review of wild and synantropic birds recorded as reservoirs of avian influenza viruses in Bulgaria. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 23(3).
- OIE. (2021). *Influenza aviar (incluida la infección por los virus de la influenza aviar altamente patógenos)*. Manual terrestre de la OIE.
- Organización Panamericana de la Salud / Organización Mundial de la Salud. (2023). *Actualización Epidemiológica Brotes de influenza aviar causados por influenza A(H5N1) en la Región de las Américas*.
- Perera, C., Díaz de Arce, H., & Pérez, L. (2011). Actualización y perspectivas en el diagnóstico del virus de la influenza aviar. *Revista de Salud Animal*, 33(1), 01-07.

- Pérez, A., Zaccagnini, M., & Pereda, A. (2011). La Influenza Aviar y sus implicancias para la salud de las aves silvestres de América del Sur. *El hornero*, 26(1), 29-44.
- Rimondi, A. (2014). *Estudio de la patogenia del Virus de Influenza Aviar de baja patogenicidad en aves de corral inmunosuprimidas por la afección con el virus de la Anemia Infecciosa Aviar* (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales).
- Ríos, O., García, I., & Mosquera, J. (2007). Inventario de aves Passeriformes en áreas de expansión urbana en el municipio de Quibdó, Chocó, Colombia. *Revista de investigaciones*, 26(1).
- Rondón, J., Icochea, E., González, A., & González, R. (2013). Vigilancia dirigida de influenza aviar en aves silvestres usando patos domésticos (*Cairina moschata*) como centinelas. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 24(3), 324-336.
- Rose, K., Newman, S., Uhart, M., & Lubroth, J. (2006). *Wild bird highly pathogenic avian influenza surveillance: sample collection from healthy, sick and dead birds* (Vol. 4). Food & Agriculture Org.
- Runstadler, J., Happ, G., Slemons, R., Sheng, Z., Gundlach, N., Petrula, M., & Taubenberger, J. (2007). Using RRT-PCR analysis and virus isolation to determine the prevalence of avian influenza virus infections in ducks at Minto Flats State Game Refuge, Alaska, during August 2005. *Archives of virology*, 152(10), 1901-1910.
- Sánchez, A., García-Galán, A., García, E., Gómez-Martín, Á., Fe, C. D. L., Corrales, J. C., & Contreras, A. (2020). Exposición ocupacional a los virus influenza de las aves silvestres. *Revista Española de Salud Pública*, 94, 202003022.

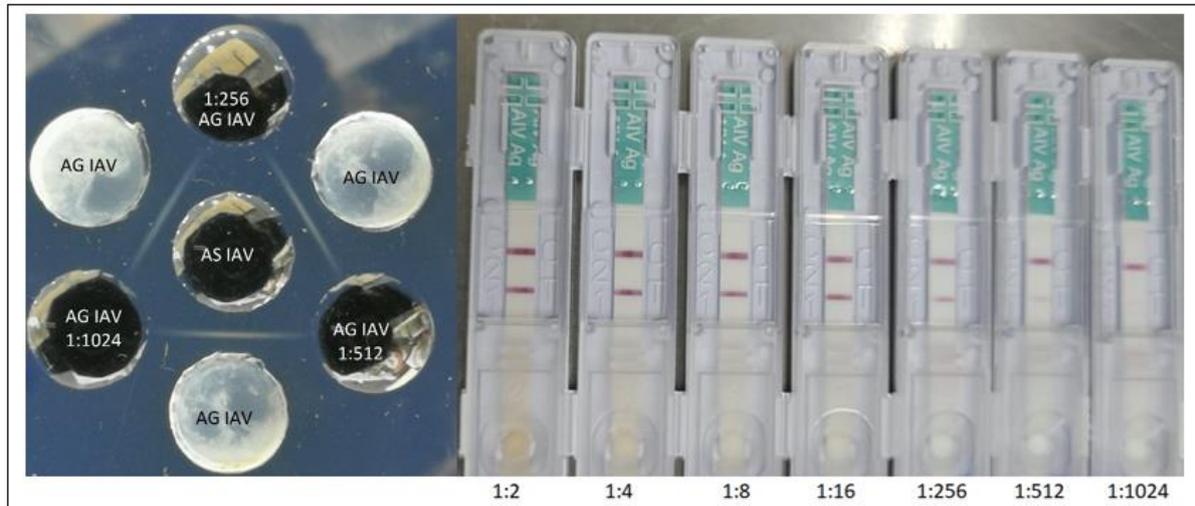
- Segovia, K., Icochea, E., González, R., Ghersi, B., & González, A. (2013). Presencia del virus de influenza aviar en aves silvestres de los humedales de Puerto Viejo, Lima. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 24(1), 98-103.
- SENASA. (2023). *Protocolo de Influenza Aviar de Alta Patogenicidad en Fauna Silvestre*. Servicio Nacional de Salud Animal. Costa Rica.
- SENASAG. (2016). *Manual de procedimientos de atención ante una ocurrencia de influenza aviar*. Servicio nacional de sanidad agropecuaria e inocuidad alimentaria. Bolivia.
- Spackman, E., Senne, D., Myers, T., Bulaga, L., Garber, L., Perdue, M., Lohman, K., Daum, L., Suarez, D. (2002). Development of a Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A Influenza Virus and the Avian H5 and H7 Hemagglutinin Subtypes. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(9), 3256–3260. doi:10.1128/jcm.40.9.3256-3260.2002
- SCIJ. (2020). Ley de Conservación de la Vida Silvestre. Ley No. 7317. La Gaceta, (235).
- SINAC. (2021). *Inventario de sitios de manejo de vida silvestre registrados por el SINAC a nivel nacional*. Sistema nacional de áreas de conservación. Costa Rica.
- Uyeki, T. M., & Peiris, M. (2019). Novel avian influenza A virus infections of humans. *Infectious Disease Clinics*, 33(4), 907-932.
- Valles, E. (2023). *Pelecanus occidentalis*, víctima y reservorio de infecciones por A (H5N1) y enteroparasitosis transmisibles al hombre. *Revista Médica Sinergia*, 8(01).

- Vargas, R., & Ramírez, O. (2012). Defensa territorial de *Buteo nitidus* y *Quiscalus mexicanus* ante depredación de *Falco peregrinus* en el Valle Central de Costa Rica. *Zeledonia*, 16(1), 15-24.
- Villavicencio, M. (2018). *Evaluación de un plan de enriquecimiento ambiental para aves silvestres cautivas en el zoológico municipal "Parque Orillas del Zamora"*. Tesis de grado. Ecuador.
- Villarreal, J. (2010). *Uso de hábitat diferencial de aves playeras migratorias (Charadriiformes) en la costa oeste de la península de Nicoya, Costa Rica*. *Dialnet*, 14(1), 13.
- Wallensten, A. (2006). *Influenza A virus in wild birds* (Doctoral dissertation, Institutionen för molekylär och klinisk medicin).
- Wibowo, M., Untari, T., Artanto, S., Putri, K., Amanu, S., & Asmara, W. (2016). Evaluation of rapid detection kit against avian influenza A virus and H5 subtype for field Sample. *Indonesian Journal of Biotechnology*, 21(1), 48-55.
- World Health Organization. (2021). *WHO information for the molecular detection of influenza viruses*.
- World Organisation for Animal Health. (2023). Panama - *Influenza A viruses of high pathogenicity* (Inf. with) (non-poultry including wild birds) (2017-) - Follow up report 2.
- Yuan, J., Reed, A., Chen, F., & Stewart, C. (2006). Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC bioinformatics*, 7(1), 1-12.

VIII. ANEXOS

Anexo 1

Comparación de resultados entre diluciones 1:256, 1:512 y 1:1024 de control positivo de influenza aviar entre la prueba de inmunodifusión en gel de agar y la prueba rápida de inmunocromatografía



**CARTA DE AUTORIZACIÓN PARA USO Y MANEJO DE LOS TRABAJOS
FINALES DE GRADUACIÓN
UNIVERSIDAD TÉCNICA NACIONAL**

Atenas, 22 de setiembre, 2023.

Señores

Vicerrectoría de Investigación

Sistema Integrado de Bibliotecas y Recursos Digitales

Estimados señores:

Nombre de sustentantes	Cédula
Beatriz Cano Murrieta	207940072

Nosotros en calidad de autores del trabajo de graduación titulado:

Estudio epidemiológico sobre el virus de la influenza aviar en aves silvestres localizadas en centros de rescate de vida silvestre del Valle Central y determinación de su presencia en aves silvestres de vida libre muertas o enfermas reportadas al SENASA en Costa Rica durante el 2023.

El cual se presenta bajo la modalidad de:

Seminario de Graduación

Proyecto de Graduación

Tesis de Graduación

Presentado en la fecha 22/09/2023, autorizamos a la Universidad Técnica Nacional, sede Atenas, para que nuestro trabajo pueda ser manejado de la siguiente manera:

Autorizamos	
Conservación de ejemplares para préstamo y consulta física en biblioteca	X
Inclusión en el catálogo digital del SIBIREDI (Cita catalográfica)	X
Comunicación y divulgación a través del Repositorio Institucional	X
Resumen (Describe en forma breve el contenido del documento)	X
Consulta electrónica con texto protegido	X
Descarga electrónica del documento en texto completo protegido	X
Inclusión en bases de datos y sitios web que se encuentren en convenio con la Universidad Técnica Nacional contando con las mismas condiciones y limitaciones aquí establecidas.	X

Por otra parte, declaramos que el trabajo que aquí presentamos es de plena autoría, es un esfuerzo realizado de forma conjunta, académica e intelectual con plenos elementos de originalidad y creatividad. Garantizamos que no contiene citas, ni transcripciones de forma indebida que puedan devenir en plagio, pues se ha utilizado la normativa vigente de la American Psychological Association (APA). Las citas y transcripciones utilizadas se realizan en el marco de respeto a las obras de terceros. La responsabilidad directa en el diseño y presentación son de competencia exclusiva, por tanto, se exime de toda responsabilidad a la Universidad Técnica Nacional.

Conscientes de que las autorizaciones no reprimen nuestros derechos patrimoniales como autores del trabajo. Confiamos en que la Universidad Técnica Nacional respete y haga respetar nuestros derechos de propiedad intelectual.

Nombre del estudiante	Cédula	Firma
Beatriz Cano Murrieta	207940072	<i>Beatriz Cano</i>

Día: 22-09-2023