



**UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA
SEDE GUAYAQUIL**

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

**DETECCIÓN DE INFLUENZA AVIAR A(H5) MEDIANTE LA TÉCNICA
MOLECULAR RT-QPCR EN UNA COLONIA DE ALBATROS (*PHOEBASTRIA
IRRORATA*) DE LA ISLA ESPAÑOLA, GALÁPAGOS - ECUADOR**

Trabajo de titulación previo a la obtención del
Título de Ingeniería en Biotecnología

AUTOR:

VERÓNICA LISSETH BUENDÍA SOLÍS

TUTORES:

**VERÓNICA ESTEFANÍA MONTENEGRO BENALCÁZAR
GUSTAVO JIMÉNEZ-UZCÁTEGUI**

GUAYAQUIL-ECUADOR

2024

CERTIFICADO DE RESPONSABILIDAD Y AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, Verónica Lisseth Buendía Solís con documento de identificación N° 2000133492 manifiesto que:

Soy el autor y responsable del presente trabajo; y, autorizo a que sin fines de lucro la Universidad Politécnica Salesiana pueda usar, difundir, reproducir o publicar de manera total o parcial el presente trabajo de titulación.

Guayaquil, 04 de marzo del año 2024

Atentamente,



Verónica Lisseth Buendía Solís

C I: 2000133492

**CERTIFICADO DE CESIÓN DE DERECHOS DE AUTOR DEL TRABAJO DE
TITULACIÓN A LA UNIVERSIDAD POLITÉCNICA SALESIANA**

Yo, **Verónica Lisseth Buendía Solís** con documento de identificación No. 2000133492, expreso mi voluntad y por medio del presente documento cedo a la Universidad Politécnica Salesiana la titularidad sobre los derechos patrimoniales en virtud de que soy autor del trabajo experimental: **“DETECCIÓN DE INFLUENZA AVIAR A(H5) MEDIANTE LA TÉCNICA MOLECULAR RT-QPCR EN UNA COLONIA DE ALBATROS (*PHOEBASTRIA IRRORATA*) DE LA ISLA ESPAÑOLA, GALÁPAGOS – ECUADOR”** el cual ha sido desarrollado para optar por el título de: *Ingeniera en Biotecnología*, en la Universidad Politécnica Salesiana, quedando la Universidad facultada para ejercer plenamente los derechos cedidos anteriormente.

En concordancia con lo manifestado, suscribo este documento en el momento que hago la entrega del trabajo final en formato digital a la Biblioteca de la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 04 de marzo del 2024

Atentamente,



Verónica Lisseth Buendía Solís

C I: 2000133492

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, **Verónica Estefanía Montenegro Benalcázar** con documento de identificación N° 0604114546, docente de la Universidad Politécnica Salesiana, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **“DETECCIÓN DE INFLUENZA AVIAR A(H5) MEDIANTE LA TÉCNICA MOLECULAR RT-QPCR EN UNA COLONIA DE ALBATROS (*PHOEBASTRIA IRRORATA*) DE LA ISLA ESPAÑOLA, GALÁPAGOS – ECUADOR”**, realizado por Verónica Lisseth Buendía Solís con documento de identificación N° 2000133492, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo Experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 04 de marzo del 2024

Atentamente,



Verónica Estefanía Montenegro
C I: 0604114546

CERTIFICADO DE DIRECCIÓN DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Yo, **Gustavo Jiménez-Uzcátegui** con documento de identificación N° 1709610461, Investigador Científico Sénior de la Fundación Charles Darwin, declaro que bajo mi tutoría fue desarrollado el trabajo de titulación: **“DETECCIÓN DE INFLUENZA AVIAR A(H5) MEDIANTE LA TÉCNICA MOLECULAR RT-QPCR EN UNA COLONIA DE ALBATROS (*PHOEBASTRIA IRRORATA*) DE LA ISLA ESPAÑOLA, GALÁPAGOS – ECUADOR”**, realizado por Verónica Lisseth Buendía Solís con documento de identificación N° 2000133492, obteniendo como resultado final el trabajo de titulación bajo la opción Trabajo Experimental que cumple con todos los requisitos determinados por la Universidad Politécnica Salesiana.

Guayaquil, 04 de marzo del 2024

Atentamente,



Gustavo Jiménez - Uzcátegui

C I: 1709610461

Agradecimientos

A la carrera de Ingeniería en Biotecnología de la Universidad Politécnica Salesiana y todos quienes forman parte de esta noble institución. Un agradecimiento especial al MSc. Jaime Naranjo por su apoyo y por permitirme conocer el mundo de la investigación de manera dinámica.

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a la Fundación Charles Darwin (FCD), por la oportunidad que me han brindado de contribuir a este importante estudio. El apoyo brindado ha sido fundamental para mi desarrollo profesional en el ámbito de la conservación de las Islas Galápagos. Orientada a fortalecer más iniciativas, para explorar y aplicar soluciones innovadoras basadas en biotecnología.

Agradecimiento al proyecto "Especies clave de Galápagos: Estudio de la Dinámica Poblacional de Aves Marinas Frente a sus Amenazas N° PC-48-23" liderado por el Investigador Científico Sénior Gustavo Jiménez-Uzcátegui.

A la Agencia de Regulación y Control de la Bioseguridad y Cuarentena para Galápagos (ABG) por otorgarme las facilidades para el desarrollo de los procedimientos prácticos en el laboratorio de Biología Molecular.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Doctor Gustavo Jiménez Uzcátegui, quien me ofreció la valiosa oportunidad de contribuir como tesista en su proyecto. El apoyo otorgado y la confianza profesional fueron fundamentales para el desarrollo de este importante estudio.

Un especial agradecimiento a la Ingeniera Verónica Montenegro, tutora de tesis, que con paciencia y atención dirigió el proyecto hasta su culminación.

Inmensa gratitud a todas las personas que fueron parte de las salidas de campo. Al guarda parque Paúl Vaca, a la bióloga Andrea Coloma que como técnica colaboró gentilmente en la toma de los parámetros fisiológicos.

Dedicatoria

A mis padres que me han apoyado en cada una de las actividades científicas y metas académicas propuestas, por el apoyo incondicional brindado en el transcurso de mi carrera. A mi novio, por su motivación en los momentos más laboriosos; a mis hermanas por animarme en cada una de mis trabajos. A mis colegas científicos y amigos, por compartir experiencias académicas divertidas. Gracias a todos los docentes y compañeros que tuve la oportunidad de conocer a lo largo de esta profesión.

Resumen

Las enfermedades virales que afectan a las aves, señalan una gran problemática para la salud pública y el ecosistema. Los recientes brotes de influenza aviar podrían tener grandes consecuencias en las Islas Galápagos, debido a su fragilidad ambiental y a la biodiversidad única que albergan las islas. La falta de conocimiento, la escasez de información, el cambio climático y los recursos limitados, hacen que el archipiélago constituya un punto de estudio crucial sobre las enfermedades transmitidas por vectores, que pueden llegar a propagarse a nivel mundial. Debido a que, el análisis de los virus en aves silvestres es complejo. La presente investigación busca diagnosticar el subtipo de influenza aviar A (H5) en una colonia de albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*) que habitan en la Isla Española. Los datos estadísticos destacan información sobre la influenza aviar, al obtener correlaciones bajas entre las variables frecuencia respiratoria - frecuencia cardíaca ($r = 0,40$), frecuencia cardíaca - temperatura corporal ($r = 0,20$), para comprender el estado de salud de las aves. Además, esta revisión busca puntualizar la futura investigación de enfermedades infecciosas en aves endémicas del archipiélago para su conservación, y la implementación de medidas estrictas para reducir la posibilidad de pandemias por causa de virus zoonóticos.

Palabras clave: albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*), influenza aviar, virus, zoonosis.

Abstract

Viral diseases affecting birds pose a major problem for public health and the ecosystem. Recent outbreaks of avian influenza could have major consequences in the Galapagos Islands due to their environmental fragility and unique biodiversity. Lack of knowledge, scarcity of information, climate change and limited resources make the archipelago a crucial study point for vector-borne diseases that have the potential to spread globally. Because the analysis of viruses in wild birds is complex. The present investigation seeks to diagnose avian influenza subtype A (H5) in a colony of Galapagos albatrosses (*Phoebastria irrorata*) inhabiting Española Island. Statistical data highlight the information on avian influenza, obtaining low correlations between the variables respiratory frequency-heart rate ($r=0.40$), between heart rate-body temperature ($r=0.20$), to understand the health status of the birds. In addition, this review seeks to point out future research on infectious diseases in endemic birds of the archipelago for their conservation, and the implementation of strict measures to reduce the possibility of pandemics caused by zoonotic viruses.

Key words: the Galápagos albatross (*Phoebastria irrorata*), avian influenza, virus, zoonosis.

Tabla de contenido

.....	1
CAPÍTULO I.....	1
Antecedentes	1
1.1. Introducción	1
1.2. Problema de investigación	4
1.3. Justificación	5
1.4. Delimitación	6
1.5. Pregunta de investigación	7
1.6. Objetivos	7
1.6.1. Objetivo general	7
1.6.2. Objetivos específicos	7
1.7. Hipótesis.....	7
CAPÍTULO II	8
Marco teórico	8
2.1. Enfermedades respiratorias en aves	8
2.2. Enfermedades respiratorias virales en aves.....	9
2.2.1. Influenza aviar	9
2.2.2. Enfermedad de Newcastle	10
2.2.3. Bronquitis infecciosa	10
2.2.4. Laringotraqueitis Infecciosa.....	11
2.3. Enfermedades respiratorias bacterianas en aves	11
2.3.1. Mycoplasmosis	11
2.3.2. Tuberculosis	11
2.4. Aves endémicas del Ecuador	12
2.5. Aves endémicas de Galápagos.....	13
2.6. Influenza aviar	15
2.6.1. Etiología	15
2.6.2. Subtipos y linajes:.....	16
2.6.3. Diagnóstico del virus de la influenza Aviar	16
2.7. Amenazas de la avifauna de Galápagos	18
2.8. Albatros de Galápagos.....	19
2.9. Marco Legal	20
2.9.1. Ley para la conservación y uso sustentable de la biodiversidad título I del objeto y principios de la ley Capítulo I Del Objeto de la Ley.....	20
2.9.3. Sección I Del Sistema Nacional de Áreas Naturales Protegidas	21
2.9.4. Parágrafo I Del Patrimonio Nacional de Áreas Naturales	22
2.9.5. Sección IV De Otros Mecanismos e Instrumentos para la Conservación In Situ	23
2.9.6. Capítulo II De la Conservación Ex Situ	23
2.9.7. La Dirección Ejecutiva de la Agencia de Regulación y Control de la Bioseguridad y	

Cuarentena para Galápagos (ABG)	24
CAPÍTULO III	25
3.1. Materiales y métodos	25
3.2. Metodología de investigación	26
3.2.1. Fase de campo	26
3.2.2. Fase experimental	27
3.3. Población	27
3.4. Muestra	28
3.5. Análisis de laboratorio	28
3.6. Variables	29
3.6.1. Variable dependiente	29
3.6.2. Variables independientes	30
3.7. Protocolos	30
3.7.1. Plan Nacional de contingencia para influenza aviar	30
3.7.2. Protocolo Nacional de diagnóstico	30
3.7.3. Protocolo de Bioseguridad (Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades)	31
CAPÍTULO IV	34
Resultados y discusión	34
4.1. Resultados	34
4.1.1. Muestra de cloaca	37
4.1.2. Muestra de tráquea	38
4.1.3. Análisis de estadística descriptiva	39
4.2. Discusión	42
CAPÍTULO V	44
Conclusiones y recomendaciones	44
5.1. Conclusiones	44
5.2. Recomendaciones	45
Bibliografía	47
Anexos	50

Índice de Tablas

Tabla 1. Enfermedades respiratorias en aves	8
Tabla 2. Aves acuáticas endémicas de las Islas Galápagos.....	14
Tabla 3. Materiales, equipos y reactivos.....	25
Tabla 4. Base de datos de albatros muestreados, variables fisiológicas y resultados de la prueba RT-qPCR.....	35
Tabla 5. Resumen estadístico de características fisiológicas tomadas en campo	39

Índice de Anexos

Anexo 1.	Captura de albatros de las Galápagos (<i>Phoebastria irrorata</i>)	50
Anexo 2.	Albatros de las Galápagos (<i>Phoebastria irrorata</i>) capturado.....	50
Anexo 3.	Marcaje de albatros de las Galápagos	51
Anexo 4.	Muestreo mediante hisopado estéril de	51
Anexo 5.	Materiales para el muestreo en campo.	52
Anexo 6.	Laboratorio LabGal, lugar donde se procesaron las muestras	52
Anexo 7.	Muestras de hisopado en los criotubos.....	52
Anexo 8.	Extracción de ARN del virus de influenza aviar.	53
Anexo 9.	Ciclo de amplificación de la PCR - Termociclador BIO - RAD	53

CAPÍTULO I

Antecedentes

1.1.Introducción

La influenza aviar es una enfermedad viral; altamente contagiosa que afecta a muchas especies de aves. Esta enfermedad ha causado creciente preocupación debido a su potencial zoonótico y la alta tasa de mortalidad asociada en humanos (Cui et al., 2022).

Las aves participan de forma eficaz en la transmisión y diseminación de enfermedades al actuar como hospedadores amplificadores (Angeletti & Yantorno, 2023). En las aves acuáticas, como albatros, pingüinos y piqueros patas azules circulan virus con variabilidad genética diversa que consideran su reservorio natural, sin embargo, no experimentan signos de la enfermedad o padecen síntomas leves. Los virus en aves se replican tanto en el tracto respiratorio e intestinal de forma normal, y se eliminan en el ambiente donde otros huéspedes se infectan (World Organisation for Animal Health (WOAH), 2023).

Los virus que se encuentran en calidad de reservorio en aves silvestres acuáticas pueden infectar a otras especies de aves, incluidas las aves terrestres. Además, puede afectar a mamíferos como perros, cerdos, mamíferos marinos, incluido el ser humano (Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades, 2023) .

La globalización en las últimas décadas ha contribuido a la dispersión y aparición de nuevos virus de influenza que amenazan la salud humana y animal, los cuales tienen la capacidad de propagarse rápidamente por todo el mundo, lo que

enmarca la urgencia de reconocer y estimar los factores de riesgo asociados con las aves como vectores de enfermedades (Morano et al., 2021).

Desde noviembre de 2022 a la fecha, el Ecuador ha atravesado un estado de emergencia zoonosanitaria establecido por el Ministerio de Agricultura y Ganadería, (MAG) tras detectarse influenza aviar H5 en aves de corral de granjas avícolas, y nuevos casos en diferentes zonas del país, siendo esta enfermedad un desafío significativo para la salud pública, la conservación de especies en peligro, el sector productivo, etc. (Fondo de Inversión Ambiental Sostenible, 2018).

Mientras tanto, el comunicado del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) indica que el monitoreo y la vigilancia técnica es esencial para detectar oportunamente los casos. Tras la amenaza de enfermedades emergentes, la avifauna de las Islas Galápagos se ha visto afectada por la llegada de la influenza aviar desde septiembre del 2023, en donde se dio a conocer mediante un informe emitido por los guías de la Dirección del Parque Nacional Galápagos la existencia de aves muertas y otras con síntomas, en la Isla Genovesa Wolf y San Cristóbal (Punta Pitt). Bajo esta amenaza, la Dirección del Parque Nacional Galápagos (DPNG) hace una reunión con las instituciones que conforman el Comité de influenza aviar, que son, la Agencia de Control y Regulación de la Bioseguridad y Cuarentena para Galápagos (ABG), el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), el Consejo de Gobierno del Régimen Especial de Galápagos (CGREG) y la Fundación Charles Darwin, quienes accionaron de forma inmediata (Jiménez-Uzcátegui G. , 2023).

En este contexto, la vigilancia epidemiológica en poblaciones de aves acuáticas, como los albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*), es crucial para la detección

temprana de brotes de influenza aviar y la implementación de medidas de control para proteger la salud pública y la conservación de la biodiversidad (Simancas-Racines et al., 2023).

El albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*) considerada el ave más grande del archipiélago. Hace una década se estimó una población entre 33.000 – 35.000 individuos, pero las investigaciones sobre su supervivencia y amenazas muestran disminuciones poblacionales (Jiménez - Uzcátegui G. , 2018).

El albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*) es una especie bioindicadora ecotoxicológica, dado al encontrarse al tope de la cadena alimentaria muestra una bioacumulación endógena, así como una bioacumulación exógena por la capacidad de absorber metales pesados presentes en el aire o que proceden de corrientes marinas. Además, esta especie centinela desempeña un papel crucial al funcionar como una advertencia tangible de los cambios en el ecosistema, debido a su sensibilidad frente al fenómeno El Niño (Jiménez - Uzcátegui G. et al., 2019).

El propósito de esta investigación fue conocer la situación actual de las aves endémicas de la Isla Española, Galápagos, con un enfoque particular en los albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*), especies en peligro crítico. De la misma manera ampliar proyectos de protección y conservación, debido a la necesidad de examinar las condiciones de bienestar y salud de estos animales.

1.2. Problema de investigación

En las Islas Galápagos periódicamente se realizan controles y monitoreos para conocer las condiciones de bienestar y salud de las especies. Por medio de los guías naturalistas de la Dirección del Parque Nacional Galápagos (DPNG) se informó la presencia de aves infectadas con el virus de la influenza aviar en islas Wolf, Genovesa y San Cristóbal (en Punta Pitt), lo cual causó alerta al Comité de influenza aviar, lo que llevó a realizar un análisis exhaustivo en las islas mencionadas incluyendo la Isla Española, sitio donde habitan varias especies de aves marinas endémicas (Fondo de Inversión Ambiental Sostenible, 2018).

El albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*) se encuentra catalogado como una especie en Peligro Crítico (CR) de la Lista Roja de las Especies amenazadas a nivel mundial, es considerada una especie endémica para el Ecuador, con una mayor concentración poblacional en la Isla Española. Dada su situación de vulnerabilidad, requiere atención especial, es imperativo realizar estudios para comprender su estado de salud y aplicar medidas preventivas contra la propagación del virus de influenza aviar, para garantizar su supervivencia y conservación (Freile et al., 2019).

Es relevante resaltar que esta investigación busca centralizar el estudio molecular del subtipo (H5) de influenza aviar tipo A, y evaluar el estado epidemiológico de una colonia de albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*) de la Isla Española, Galápagos. Adquiriendo información esencial para comprender las amenazas que enfrenta la especie e implementar medidas de prevención efectivas.

1.3. Justificación

La detección del virus de influenza aviar en especies de aves acuáticas se considera un punto importante para la implementación de medidas de control y prevención del virus, reducción del riesgo de transmisión a humanos y el monitoreo epidemiológico. Además, para salvaguardar la salud pública, la riqueza natural y evitar así la afectación ambiental, turística y económica de las islas Galápagos (Alto & Moderado, 2023).

Las aves acuáticas de laguna son el principal reservorio natural de la mayoría de los subtipos de los virus de la influenza aviar. En este sentido, las enfermedades que causan mayor problema a las aves son de origen vírico. Por ende, es fundamental investigar su patogenicidad para lograr la detección temprana del virus, así se evita el riesgo de contagio o graves tasas de mortalidad (Alto & Moderado, 2023).

Al realizar la investigación sobre influenza aviar, se contribuye a la valoración y al diagnóstico virológico del estado de salud de los albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*), permitiendo de esta manera aportar con información de la presencia o ausencia del virus. Dado a que es uno de los primeros aportes relacionados con influenza aviar. Se aporta con datos que servirán para tomar acciones oportunas a fin de evitar la propagación de la enfermedad.

1.4.Delimitación

La investigación se llevó a cabo en Punta Suarez, zona ubicada al oeste de la Isla Española, Archipiélago de Galápagos ($1^{\circ}22'00''\text{S}$ $89^{\circ}41'00''\text{O}$)

Las muestras biológicas fueron transportadas y analizadas en el laboratorio de Biología Molecular de la Agencia de Regulación y Control de la Bioseguridad y Cuarentena para Galápagos - LabGal, Isla Santa Cruz.

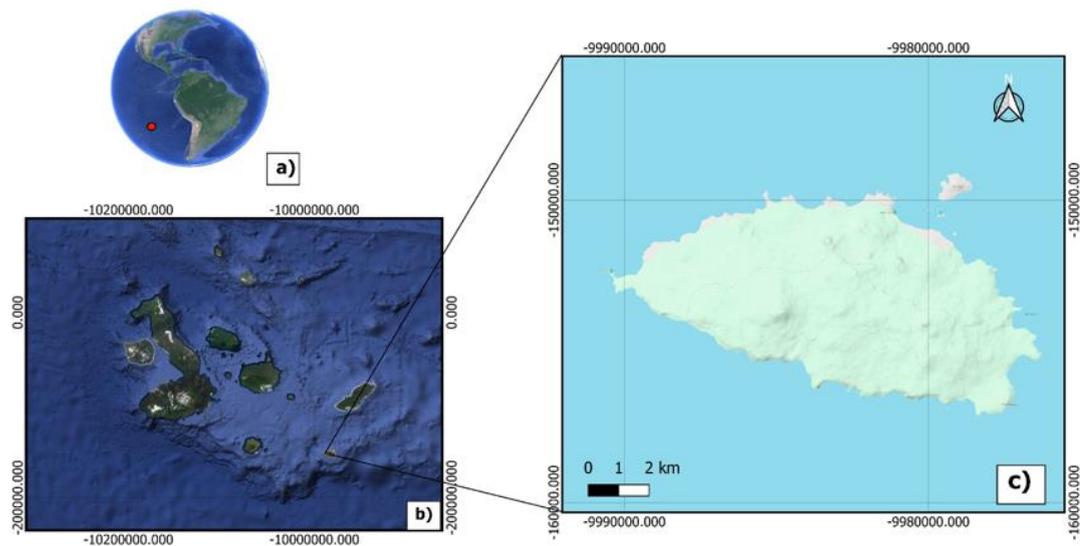


Figura 1. a) Planeta tierra, b) Archipiélago de Galápagos, c) Isla Española (área de estudio)

1.5.Pregunta de investigación

¿Cuál es el estado de salud de la población de albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*) de la Isla Española, frente al virus de la influenza aviar, y qué medidas de prevención se pueden implementar para proteger la especie?

1.6.Objetivos

1.6.1. Objetivo general

Detectar la presencia de influenza aviar A(H5) mediante la técnica molecular RT- qPCR en una colonia de albatros (*Phoebastria irrorata*) de la Isla Española, Galápagos – Ecuador.

1.6.2. Objetivos específicos

- ✓ Delimitar la zona de muestreo para la captura y marcaje de las aves de interés.
- ✓ Caracterizar los parámetros fisiológicos de los albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*) muestreados para la obtención detallada de su estado de salud.
- ✓ Identificar el virus de la influenza aviar A(H5) a través de la técnica por hisopado RT-qPCR.

1.7. Hipótesis

La población de albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*) en Punta Suarez, de la Isla Española en Galápagos presenta el virus de la influenza aviar.

CAPÍTULO II

Marco teórico

2.1. Enfermedades respiratorias en aves

Las enfermedades respiratorias en aves son un grupo de patologías que afectan al sistema respiratorio de las aves, incluyendo los pulmones, la tráquea y los sacos aéreos. Estas enfermedades pueden ser producidas por patógenos como virus, bacterias, hongos, protozoos y helmintos (Rani et al., 2020).

Las enfermedades respiratorias que afectan a las aves pueden manifestarse con una variedad de síntomas, incluyendo la dificultad para respirar, disnea, epistaxis, tos, estornudos, secreciones nasales, cianosis, descargas oculares, pérdida de apetito, entre otros. (Rani et al., 2020).

En la siguiente tabla se presenta algunos ejemplos de enfermedades respiratorias en aves.

Tabla 1. Enfermedades respiratorias en aves (Buendía, 2024)

Agentes causantes	Enfermedad
Virus	Influenza aviar
	Newcastle
	Bronquitis infecciosa aviar
	Laringotraqueitis infecciosa aviar
	<i>Pneumovirus aviar</i>
Bacteria	Micoplasmosis
	Tuberculosis
	Pasteurelosis aviar

2.2. Enfermedades respiratorias virales en aves

Factores que determinan la aparición viral están relacionados con la adaptación de un virus determinado a nuevas especies hospedadoras y a la presencia de cambios ambientales que le brinden nuevas oportunidades para prosperar (Williams et al., 2023).

Muchas especies pueden actuar como reservorios virales naturales, así como huéspedes amplificadores en los ciclos ave-vector-ave. Así mismo las aves pueden actuar como fuente de genes de virus emergentes que luego pueden transmitirse a otras especies, incluyendo a los humanos. Un ejemplo notable son los nuevos virus de la influenza que pueden evolucionar mediante recombinación genética (Williams et al., 2023).

2.2.1. Influenza aviar

Esta enfermedad es causada por un virus de la influenza tipo A de la familia Orthomyxoviridae, que se transmite por vía respiratoria y por contacto de heces infectadas. Los virus se replican en el tracto intestinal y en el respiratorio. La gravedad de la enfermedad depende en gran medida de la cepa que lo origina, Principalmente afecta al sistema respiratorio. Es un virus que tiene alta variación genética, va evolucionando y adaptándose al medio, lo que hace que ocurran brotes con cepas de mayor de patogenicidad (De la Peña, 2018).

Los virus se replican en el tracto intestinal y en el respiratorio, por tanto, los animales enfermos pueden manifestar alteraciones del sistema respiratoria, reproductor, digestivo o nervioso (Padilla Noriega et al., 2004).

2.2.2. Enfermedad de Newcastle

Altamente contagiosa, descrita por primera vez en la ciudad de Newcastle (Inglaterra) en 1926 por Doyle. Los virus de esta enfermedad pertenecen al serotipo paramixovirus aviar tipo 1 (APMV-1). Las cepas del APMV-1 se clasifican según su virulencia, en tres patotipos: lentogénicas (menos virulentas), mesogénicas (moderadamente virulentas) o velogénicas (más virulenta) (Baumberger et al., 2018).

El virus se transmite en aves por inhalación, contacto con las mucosas o por ingestión, dependiendo de diferentes factores ambientales. Es difundida por tos o estornudos, material fecal, por alimentos contaminados, exudados y despojos de aves infectadas. La transmisión puede darse por contacto directo con aves enfermas o portadoras. La vía de entrada del virus al organismo es la respiratoria y la bucal. El periodo de incubación es de 2 a 25 días. Los humanos infectados por la enfermedad de Newcastle manifiestan conjuntivitis, pero suele ser leve y limitada (Kozdruń et al., 2015).

2.2.3. Bronquitis infecciosa

Enfermedad contagiosa que afecta únicamente al grupo de aves gallináceas, el virus se transmite mediante la parvada. La enfermedad es caracterizada por síntomas respiratorios como estornudos, conjuntivitis, depresión tos y dificultad para respirar. Los pollos muestran signos clínicos de 24 a 48 horas después de la infección. La causa de esta enfermedad es un coronavirus envuelto en ARN de cadena única. Las cepas necrobióticas de los virus de la bronquitis infecciosa causan trastornos como edema, basofilia, cuadros inflamatorios a los riñones y hemorragias que hacen que la tasa de mortalidad incremente (Lorenzoni & Domínguez, 2021).

2.2.4. Laringotraqueitis Infecciosa

Es una enfermedad viral altamente contagiosa, que afecta a aves de corral como pollos gallinas, pavos o faisanes. Es causada por un virus denominado herpes virus aviar tipo 1 (ILTV), que se caracteriza por provocar hemorragias e inflamación en la tráquea y la laringe. Las aves afectadas tienen graves complicaciones para respirar. El tiempo de incubación oscila entre 6 a 12 días posterior de la exposición al virus. La transmisión se da por contacto directo, exudados respiratorios expectorados o aerosoles, el virus ingresa por vía respiratoria o mediante la conjuntiva (Fe, 2012).

2.3. Enfermedades respiratorias bacterianas en aves

2.3.1. Micoplasmosis

Enfermedad infecciosa respiratoria, causada por bacterias del género *Mycoplasma* denominados *Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae* y *M. meleagridis*. La principal vía de entrada es la conjuntiva ocular y el epitelio respiratorio. Los signos que manifiestan son: conjuntivitis, estertores traqueales y descargas nasales. El periodo de incubación del micoplasma oscila entre 1 a 3 semanas, su diseminación dentro de la parvada es lenta. Las aves silvestres pueden estar infectadas y ser reservorios del micoplasma. Es una enfermedad imposible de erradicar debido a que las aves infectadas serán siendo portadoras incluso cuando no muestren ningún signo de la enfermedad (Lorenzoni & Domínguez, 2021).

2.3.2. Tuberculosis

Enfermedad infectocontagiosa, crónica, producida por *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium genavense*, Afecta a una amplia variedad de aves, incluyendo aves de corral, aves de caza y aves silvestres. Se transmite por excreción nasal, materia fecal y

despojos de aves. Sin embargo, algunas aves pueden ser asintomáticas de la bacteria y transmitirla a las demás aves. Esta bacteria afecta al sistema el respiratorio, se manifiesta en síntomas como tos y dificultad para respirar (Fe, 2012).

Las personas se infectan a partir de ambientes contaminados y pueden manifestar pérdida de peso, dolor abdominal, cansancio y diarrea (Kozdruń et al., 2015). La principal fuente de entrada es la digestiva. El tiempo de incubación no se conoce con exactitud, pero puede durar semanas y meses (Cabascango Martínez, 2023).

2.4. Aves endémicas del Ecuador

Las aves endémicas del Ecuador juegan un papel fundamental en el ecosistema y poseen una serie de importancias tanto ecológicas como para la conservación de la biodiversidad; Ecuador se encuentra entre los países con gran diversidad de aves (Williams et al., 2023).

La preservación de las aves endémicas del Ecuador es crucial, debido a que actúan como agentes de polinización y dispersión, ayudan al control biológico de plagas y equilibran tanto ecosistemas terrestres y acuáticos; es importante resaltar que muchas especies de aves enfrentan amenazas como la pérdida de hábitat, la perturbación humana, especies invasoras, la contaminación, la caza furtiva, la pesca con palangre, por lo que cabe procurar establecer medidas de protección (Jiménez-Uzcátegui G. et al., 2019).

Las aves marinas son parte integral de los ecosistemas acuáticos del país; la presencia y el estado de las poblaciones de aves acuáticas pueden servir como indicadores importantes de la salud de los ecosistemas acuáticos y terrestres en los que habitan. Cambios negativos en sus poblaciones pueden señalar problemas ambientales

más amplios, como la contaminación del agua, la degradación del hábitat o el cambio climático (Angeletti & Yantorno, 2023).

Las aves acuáticas desempeñan una variedad de funciones ecológicas importantes, incluyendo la regulación de poblaciones de presas, la dispersión de semillas y la contribución a la ciclación de nutrientes. Sin embargo, nuevas amenazas antropogénicas afectan la supervivencia de las especies frente a los cambios ambientales (Jiménez-Uzcátegui G. et al., 2019).

2.5. Aves endémicas de Galápagos

El aislamiento geográfico de Galápagos ha dado lugar a un elevado grado de endemismo; según el Parque Nacional Galápagos existen 45 aves endémicas que viven en las islas (Cabrera & Cabrera, 2021).

Tabla 2. Aves acuáticas endémicas de las Islas Galápagos

Nombre común	Nombre Científico	Categoría Global UICN	Amenazas
Albatros de las Galápagos	<i>Phoebastria irrorata</i> (Salvin, 1883)	Peligro Crítico (CR)	Captura incidental en las pesquerías artesanales, especies introducidas, condiciones climáticas causadas por El Niño
Pingüino de Galápagos	<i>Spheniscus mendiculus</i> (Sundevall, 1871)	En peligro (EN)	Especies introducidas, actividad humana (pesca, turismo), eventos climáticos de El Niño, contaminación
Piquero patas azules	<i>Sula nebouxii excisa</i> (Todd, 1948)	En peligro (EN)	Escasez de sardina (fuente de alimentación), especies introducidas, fenómeno de El Niño.
Cormorán no volador	<i>Phalacrocorax harrisi</i> (Rothschild, 1898)	Vulnerable (VU)	Eventos de El Niño, interacción humana, depredadores como gatos (<i>Felis catus</i>) y perros (<i>Canis familiaris</i>)
Gaviota de lava	<i>Leucophaeus fuliginosus</i> (Gould, 1841)	Vulnerable (VU)	Cambio climático, especies introducidas, contaminación

(Buendía, 2024)

2.6. Influenza aviar

El virus de la influenza aviar representa una gran problemática, la afección se adquiere mediante el contacto directo con animales infectados. Esta enfermedad se detectó por primera vez en aves domésticas del norte de Italia. Después en 1996 se identificó el virus H5N1 en aves acuáticas de China. El virus AH5N1 es de origen asiático es un virus de alta patogenicidad. Desde su evolución se ha detectado tanto en aves de corral como acuáticas (Angeletti & Yantorno, 2023).

Se ha demostrado que una amplia variedad de especies aviarias son susceptibles a la infección por el virus de la influenza A. Los virus de alta patogenicidad (HPAI) son aquellos que causan una enfermedad grave en las aves, principalmente asociados a los subtipos H5 y H7. Estos virus pueden provocar brotes mortales en aves de corral y otras aves de importancia económica (Cabascango Martínez, 2023).

2.6.1. Etiología

Es una enfermedad muy contagiosa, ocasionada por un virus de la familia Orthomyxoviridae, del cual existen tres tipos: influenza A, influenza B e influenza C, siendo el de mayor relevancia para el hombre, el tipo A, debido a su virulencia tiene un potencial zoonótico que causa la muerte en humanos y animales. El virus de la influenza posee una alta capacidad de mutación. Se conoce que sus cepas poseen de forma característica un patrón de combinación de dos proteínas de superficie, hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA). Se reconocen 18 subtipos de hemaglutinina y 11 subtipos de neuraminidasa. Todos los subtipos pueden causar infecciones en aves, excepto los subtipos H7N10 y H18N11 (AGROCALIDAD, 2022).

Como tal, los virus H5N1y H7N7 se consideran virus de alta patogenicidad (IAAP). El genoma viral consta de ARN que sufre muchas mutaciones y modificaciones mientras infectan el genoma del huésped, lo que da como consecuencia la formación de nuevas cepas virales capaces de evadir la inmunidad del huésped. Los virus de influenza aviar (AIV) son los causantes de un alto aumento en el número de brotes en aves de corral y en aves salvajes (Blagodatski & Trutneva, 2021).

Existe una relación entre la estructura genética y la patogenicidad de los virus de influenza aviar. La variación presente en su estructura genética y en su estructura antigénica determinan su patogenicidad. Dado a ellos, existen cepas capaces de infectar y replicarse en aves, pero la diferencia en la patogenicidad determina la gravedad de la enfermedad que causan (Adlhoch et al., 2023).

2.6.2. Subtipos y linajes:

Los subtipos más destacados por su potencial gravedad para causar enfermedades en aves de corral, aves silvestres y domésticas, son los subtipos H5, H7 y H9. De los antígenos HA y NA, el antígeno HA se divide en dos linajes filogenéticos: euroasiático y norteamericano, producto de la evolución independiente debido al limitado contacto intercontinental entre poblaciones de aves (Simancas-Racines et al., 2023).

2.6.3. Diagnóstico del virus de la influenza Aviar

Para el diagnóstico de la infección del virus de influenza aviar, se requiere la identificación y el aislamiento, dado a que los signos clínicos pueden variar

drásticamente, por tanto, el diagnóstico clínico es considerado presuntivo. Debido a eso, el diagnóstico molecular es considerado más preciso, ya que analiza el material genético, cabe considerar que tiene alta sensibilidad y especificidad (Lado et al., 2018).

La reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa cuantitativa (RT-qPCR), se usa para la cuantificación y detección de ARN, el proceso inicia cuando el ARN total o ARNm se transcribe en ADN complementario (ADNc), luego este ADNc se utiliza como plantilla para la reacción de PCR en tiempo real; la cantidad de producto se mide en cada ciclo de PCR mediante fluorescencia, esto quiere decir que añade marcadores fluorescentes para conocer la cantidad de ADN inicial y detectar variaciones genéticas; esta emisión de fluorescencia será proporcional a la cantidad de moléculas emitidas, haciendo que la técnica sea (María & Mellado, 2020).

Es importante conocer que, para iniciar la transcripción inversa se requiere de un oligonucleótido de ADN corto llamado primer o cebador para hibridarse con la cadena de ARN molde y poder proporcionar a la transcriptasa inversa un punto de partida (María & Mellado, 2020).

La cuantificación precisa de los niveles de ARN mediante esta técnica depende principalmente de distintas variables, incluida la variabilidad de la extracción de ARN, de la eficiencia de la amplificación y de la variabilidad de la transcripción inversa (Nevone et al., 2023).

La Unión Europea EURL tras formar parte del laboratorio de referencia para la gripe aviar, conjuntamente con las directrices de la Organización Mundial de la sanidad animal (OMSA) ha llevado a cabo la responsabilidad de garantizar sobre la validez de

las metodologías de diagnóstico mediante protocolos recomendados para la identificación, detección y tipificación de esta enfermedad. La influenza aviar representa una importancia zoonótica, una de las mayores preocupaciones para la salud pública mundial, para la avicultura y para la conservación de aves endémicas (De Jesús Coria-Lorenzo et al., 2019).

2.7. Amenazas de la avifauna de Galápagos

Los cambios en el medio ambiente marino están causando el decrecimiento y desaparición de aves marinas. Aunque las Islas Galápagos no ha perdido ninguna especie de ave en extinción, un significativo porcentaje de la avifauna de Galápagos es amenazado. Sin embargo, el Parque Nacional Galápagos y la Fundación Charles Darwin realizan esfuerzos de conservación para proteger especies únicas que se encuentran en las Islas Galápagos (Jiménez-Uzcátegui G., 2018).

Principales amenazas como la interacción humana, el calentamiento global, sustancias contaminantes, la pesca incidental y dirigida, destrucción de hábitat, y la introducción de enfermedades están afectando seriamente las poblaciones de albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*), especie endémica de las Islas Galápagos que actualmente se encuentra en “Peligro Crítico” según la Lista Roja de especies amenazadas UICN (Jiménez-Uzcátegui G. et al., 2018).

Las aves acuáticas forman parte de uno de los grupos de aves más amenazados del mundo: 30 % de las especies se consideran globalmente amenazas. Una de las mayores amenazas que sufren las aves, es la pesca incidental, esto ocurre cuando las aves marinas intentan atrapar los cebos de pesca o peces retirados, muchas aves se enredan en los equipos de pesca, o quedan atrapadas en los anzuelos. Muchas aves

marinas mueren por estas causas. La falta de cumplimiento de los reglamentos hace que muchas aves estén en peligro (Angeletti & Yantorno, 2023).

La degradación de los hábitats, y la introducción de enfermedades puede tener un impacto devastador en la salud de las aves, ya que pueden causar alta mortalidad, y hacerlas más susceptibles a la depredación o la inanición. A nivel poblacional, las enfermedades pueden causar una disminución significativa, reducir la diversidad genética y, de igual manera, alterar la estructura de la población lo que perjudica de forma negativa la reproducción y la supervivencia (EPI-Ecuador, 2022).

El riesgo de la introducción de enfermedades nos sirve para considerar, que la alteración de las funciones de un ecosistema puede incrementar la abundancia de patógenos humanos o vectores de enfermedades (Escalante, 2021).

2.8. Albatros de Galápagos

Los albatros de Galápagos (*Phoebastria Irrorata*) o también denominados albatros ondulados, forman parte de la familia de Diomedidae, considerada el ave más grande del archipiélago. Lleva un tipo de alimentación piscívoro, una modalidad de reproducción sexual, con una biología reproductiva de marzo a enero. Está distribuido en la Isla Española, lugar donde anida, desde Punta Cevallos por la parte sur de la isla, Punta Suarez y en pequeñas zonas dentro de la isla. Pocas parejas en Genovesa y en la isla de La Plata (Provincia de Manabí) (Jiménez-Uzcátegui G. , 2018). Hace una década se estimaba una población de 33 000 – 35 000 individuos, pero las investigaciones sobre su supervivencia y amenazas muestran disminuciones poblacionales. Es una especie bioindicadora ecotoxicológica, dado que al ser un depredador al tope de la cadena

alimentaria muestra una bioacumulación endógena, así como una bioacumulación exógena por la capacidad de absorber metales pesados presentes en el aire o que proceden de corrientes marinas. Además esta especie centinela sirve como advertencia de lo que ocurre en el ecosistema debido a su sensibilidad frente al fenómeno del niño (Jiménez-Uzcátegui G. et al., 2019).

2.9. Marco Legal

2.9.1. Ley para la conservación y uso sustentable de la biodiversidad título I del objeto y principios de la ley Capítulo I Del Objeto de la Ley

“**Artículo 1.-** La Ley para la Conservación y Uso Sustentable de la Biodiversidad tiene por objeto proteger, conservar, restaurar la biodiversidad y regular e impulsar su utilización sustentable; establece los principios generales y normas para la conservación y uso sustentable de la biodiversidad y sus servicios, el acceso a los recursos genéticos, la bioseguridad, la rehabilitación y restauración de ecosistemas degradados y la recuperación de especies amenazadas de extinción, y los mecanismos de protección de los derechos sobre la biodiversidad en materia administrativa, civil y penal. **Artículo 2.-** Para efectos de esta Ley, se entenderá por biodiversidad o diversidad biológica a la variabilidad de organismos vivos de cualquier fuente y los derivados de los mismos, incluidos: los ecosistemas terrestres y marinos, otros ecosistemas acuáticos y, los complejos ecológicos de los que forman parte; comprende la diversidad dentro de cada especie, entre especies y de los ecosistemas. La biodiversidad ecuatoriana además comprende las especies migratorias que por causas naturales se encuentren en el territorio nacional” (MAE, 2015).

2.9.2. Título III de la conservación de la biodiversidad

“**Artículo 17.-** La conservación de la biodiversidad se realizará in-situ o ex-situ dependiendo de sus características ecológicas, niveles de endemismo, peligro de extinción y erosión genética, conforme a las directrices de la Estrategia Nacional de Biodiversidad y sus correspondientes planes de acción, que serán formulados por el Ministerio del Ambiente” (MAE, 2015).

2.9.3. Sección I Del Sistema Nacional de Áreas Naturales Protegidas

“**Artículo 21.-** Los objetivos de conservación del Sistema Nacional de Áreas Naturales Protegidas son:

- a) Conservar y utilizar sustentablemente la biodiversidad y los recursos genéticos;
- b) Conservar en estado natural muestras representativas de ecosistemas, comunidades bióticas, unidades biogeográficas y regiones fisiográficas del país;
- c) Mantener las funciones ambientales y los procesos ecológicos;
- d) Conservar y utilizar sustentablemente poblaciones viables de especies silvestres;
- e) Proteger especies silvestres endémicas y amenazadas de extinción;
- f) Proteger recursos paisajísticos y formaciones geológicas o paleontológicas sobresalientes;
- g) Proteger las cuencas hidrográficas y los recursos hídricos, tanto superficiales como subterráneos;
- h) Facilitar la investigación científica y el monitoreo ambiental;
- i) Promover el mantenimiento de atributos culturales específicos y de los conocimientos tradicionales de las poblaciones locales;
- j) Contribuir a la educación ambiental de la población;

k) Brindar oportunidades sustentables para la recreación y el turismo orientado a la naturaleza y la interpretación ambiental; y,

l) Proveer bienes y servicios ambientales, económicos, sociales y culturales que puedan ser utilizados de manera sustentable, especialmente por pueblos indígenas, afro ecuatorianos y comunidades locales, asentadas al interior y en las zonas aledañas a las áreas protegidas.

Los objetivos de conservación específicos para cada categoría de manejo serán establecidos en el Reglamento General de Aplicación de esta Ley” (MAE, 2015).

2.9.4. Parágrafo I Del Patrimonio Nacional de Áreas Naturales

“**Artículo 28.-** El Patrimonio Nacional de Áreas Naturales Protegidas es el conjunto de áreas naturales de interés nacional, integrado tanto por áreas de dominio público como de propiedad privada, establecido para cumplir con los objetivos de conservación determinados en esta Ley. Las áreas del Patrimonio Nacional de Áreas Naturales Protegidas, deberán ser conservadas y utilizadas de manera sustentable bajo los términos de esta Ley. Las áreas de dominio público son inalienables, imprescriptibles e inembargables. En los predios que sean de propiedad privada podrán constituirse derechos reales con las limitaciones señaladas en esta Ley. Artículo 29.- Las áreas del Patrimonio Nacional de Áreas Naturales se clasifican por su categoría de manejo en: a) Parque Nacional; b) Reserva Biológica; c) Refugio de Vida Silvestre; d) Reserva Ecológica; e) Reserva Marina; y, f) Monumento Natural” (Resoluciones et al., 2024).

2.9.5. Sección IV De Otros Mecanismos e Instrumentos para la Conservación In Situ

“**Artículo 49.-** El Ministerio del Ambiente reconocerá y promoverá el desarrollo de mecanismos e instrumentos para la conservación in situ de la biodiversidad y sus funciones, que involucren mecanismos de iniciativa privada, pública o modalidades mixtas distintas a las del Sistema Nacional de Áreas Naturales Protegidas. Los procedimientos para la aplicación de estos mecanismos e instrumentos se sujetarán a lo establecido en la legislación nacional vigente y en las normas que establezca el Ministerio del Ambiente” (MAE, 2015).

2.9.6. Capítulo II De la Conservación Ex Situ

“**Artículo 51.-** El Estado fortalecerá la conservación de la biodiversidad silvestre ex situ como complemento de la conservación in situ y en la medida que se recuperen las poblaciones silvestres en su medio natural en condiciones controladas y documentadas. Serán objeto prioritario de conservación ex situ las poblaciones, razas o variedades y el material genético que: a) Se encuentren reducidas, en estado de erosión genética o amenazadas de extinción. b) Representen un valor estratégico científico o económico, actual o potencial. c) Sean aptas para el cultivo, domesticación o mejoramiento genético de las mismas, o que hayan sido objeto de mejoramiento, selección, cultivo y domesticación; d) Cumplan una función clave en las cadenas tróficas, especialmente aquellas que sirven para el control biológico; a) Sean parientes silvestres de especies cultivadas; b) Se encuentren actualmente en colecciones de agro biodiversidad; y, g) Constituyan especies con un particular significado religioso, sagrado o cultural” (MAE, 2015).

2.9.7. La Dirección Ejecutiva de la Agencia de Regulación y Control de la Bioseguridad y Cuarentena para Galápagos (ABG)

“La Ley Orgánica de Régimen Especial de la Provincia de Galápagos en su artículo 85, colige: La Autoridad Ambiental Nacional, a través de una entidad de derecho público adscrita, regulará y controlará la bioseguridad, realizará el control de introducción de especies exógenas hacia la provincia de Galápagos, controlará y regulará la introducción, movimiento y dispersión de organismos exóticos, por cualquier medio, que ponga en riesgo la salud humana, el sistema económico y las actividades agropecuarias de la provincia, y contribuirá a la conservación de la integridad ecológica de los ecosistemas insulares y marinos, y la biodiversidad de la provincia de Galápagos” (Agencia de la regulación y control de la bioseguridad y carentena de Galápagos., 2022).

CAPÍTULO III

3.1. Materiales y métodos

Tabla 3. Materiales, equipos y reactivos

Materiales de campo	Equipos de campo	Materiales de laboratorio	Equipos de laboratorio	Reactivos
Guantes nitrilo	Equipo de protección personal (PPE) nivel 3	de Kit de Extracción: E.Z.N.A Pathogens Kit –O Omega	Termociclador BIORAD CFX96	PBS 1X
Pesola	GPS	Guantes de nitrilo	Vortex	
PIT-tags		Puntas con filtro	Centrífuga	
Calibrador		Tubos eppendorf	Congelador	
Criotubos		Micropipeta	Baño María	
Hisopos estériles			Cabina de seguridad biológica clase 2	
Termómetro digital				
Estetoscopio				
Fundas de tela				
Torundas				
Pegamento				
Sharpie				
Marcador				
Cooler				

(Buendía, 2024)

3.2. Metodología de investigación

Nuestro estudio se basó en un método cuantitativo con el objetivo de obtener una estimación precisa de la prevalencia de la influenza aviar y de identificar los factores de riesgo asociados en las poblaciones de albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*).

Las actividades aplicadas en esta investigación son: fase de campo y experimentación.

3.2.1. Fase de campo

Se implementó un diseño de muestreo estratificado combinado con transeptos lineales.

La recolección de la muestra se llevó a cabo de forma exhaustiva en el hábitat natural de los albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*) en la Isla Española, en donde se utilizó un GPS y conocimiento georreferenciado para marcar waypoints, empleamos un muestreo estratificado y transeptos lineales, lo cual consistió en dividir la colonia y trazar rutas de observación sistemática a lo largo del área de interés, seleccionar a los individuos y tomar las características fisiológicas (sexo, edad, peso, frecuencia cardíaca, respiratoria y temperatura corporal). Considerando de forma obligatoria el uso del protocolo de bioseguridad.

Durante la recolección de los datos, se realizaron capturas de las aves de manera no invasiva y se tomaron las muestras biológicas mediante hisopado, para el análisis traqueal-coana y cloacal de los albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*) seleccionados para su posterior análisis en laboratorio.

Se empleó estrictamente el protocolo de manejo y conservación de muestras biológicas INSPI (Muñoz et al., 2022), el cual detalla las consideraciones a seguir desde

el momento de la toma de muestras hasta su ingreso al laboratorio, este protocolo garantiza la integridad y la calidad de las muestras durante todo el proceso, asegurando la fiabilidad de los resultados obtenidos, el mismo detalla una guía de las practicas recomendadas para el manejo y conservación de muestras biológicas en donde se describe las consideraciones a seguir, desde el momento de la toma de muestra hasta el ingreso al laboratorio.

3.2.2. Fase experimental

En el laboratorio Galápagos, se procesaron las muestras y se procedió al diagnóstico molecular de influenza aviar mediante la técnica RT-qPCR. La parte experimental práctica se realizó en “LabGal” perteneciente a la Agencia de Regulación y Control de la Bioseguridad y Cuarentena para Galápagos (ABG), ubicada en el Laboratorio de Biología Molecular de Puerto Ayora en la isla Santa Cruz, laboratorio con enfoque multidisciplinario, en el que se emplean técnicas moleculares como la RT-PCR y sus variantes para el diagnóstico de enfermedades animales.

3.3. Población

La población de albatros en las Islas Galápagos (*Phoebastria irrorata*): 33000 a 35,000 individuos aproximadamente, distribuidos en diversas colonias en zonas de la Isla Española y ciertas parejas en la Isla Genovesa. La especie *Phoebastria irrorata*, constituyen una parte importante del ecosistema único de las Galápagos y son objeto de interés para la conservación y la investigación científica.

3.4. Muestra

Para este estudio, se seleccionó una muestra representativa de albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*) de una colonia específica en la Isla Española, es importante mencionar que la elección de esta colonia se basó en su accesibilidad y la disponibilidad de datos históricos sobre la población de albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*) en esta área.

Se realizó una cuarentena de materiales para el trabajo en campo, tres días antes de zarpar a la Isla Española; control obligatorio del Parque Nacional Galápagos (PNG) para proceder a la zona de estudio.

Se recolectaron un total de 30 albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*) adultos durante el período de estudio, utilizando métodos de muestreo no invasivos para minimizar la perturbación a las aves y su entorno.

3.5. Análisis de laboratorio

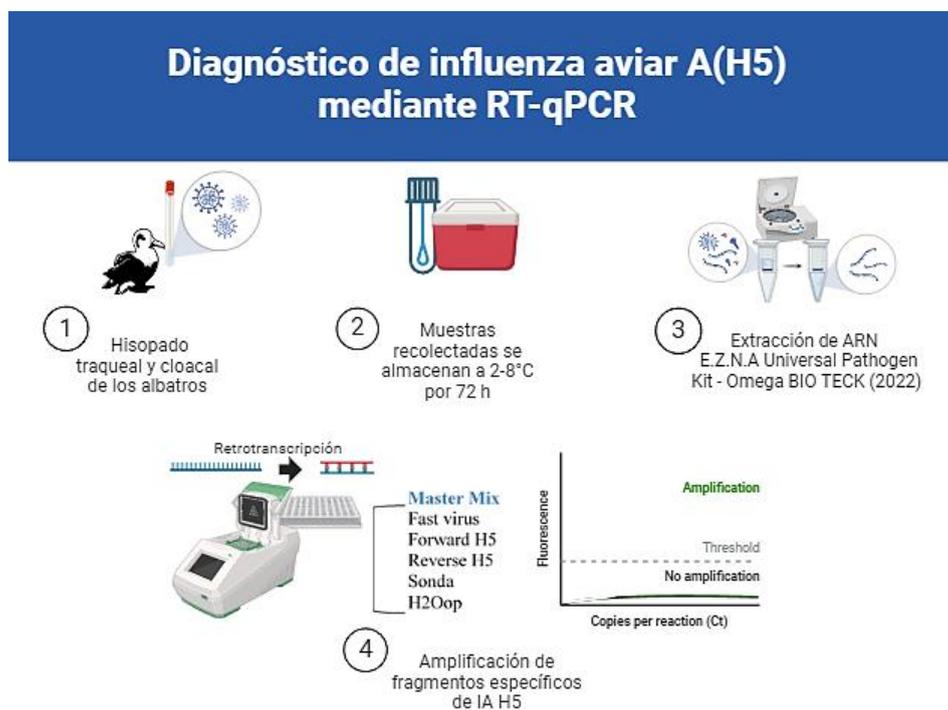
Para la realización del muestreo se utilizó un hisopo de poliéster estéril por ave. Una vez tomada la muestra, cada hisopo fue almacenado dentro de un criotubo de plástico estéril con 1 ml de buffer fosfato (PBS) 1X. Una vez en el laboratorio las muestras fueron almacenadas a -80 °C hasta proceder al diagnóstico molecular.

Para la obtención del material genético (ARN) se utilizó el kit E.Z.N.A Universal Pathogen Kit, Omega BIO – TEK (2022) (Innovations in nucleic acid isolation) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se utilizó como modelo el protocolo publicado por el Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe)(Zooprofilattico et al., 2007), y estandarizado por el Laboratorio de Biología molecular LabGal. El IZSVe es un instituto aprobado por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA) como laboratorio de referencia para el diagnóstico de

influenza aviar, mientras que LabGal es el ente rector Fito zoosanitario de la provincia de Galápagos, Ecuador.

Las muestras fueron amplificadas mediante la técnica molecular RT-qPCR, método de base nuclear que detecta la presencia de material genético específico del virus de la influenza aviar (Zooprofilattico et al., 2007).

Ilustración 1. Prueba de diagnóstico molecular de Influenza aviar



Fuente: (Buendía, 2024)

3.6. Variables

Las variables que se tomaron en cuenta en el presente estudio fueron:

3.6.1. Variable dependiente

- ✓ Técnica molecular RT-qPCR utilizada para el diagnóstico de influenza aviar en albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*).

3.6.2. Variables independientes

- ✓ Factores de riesgo que influyen en la presentación de la enfermedad.
- ✓ Exposición con las aves marinas.
- ✓ Presencia de otras especies de aves.
- ✓ Procedencia.
- ✓ Zonas de la isla.

3.7. Protocolos

Se utilizó los siguientes protocolos:

3.7.1. Plan Nacional de contingencia para influenza aviar

Es necesario documentar en forma lógica las actividades a ejecutar con demás profesiones responsables para la contención oportuna y eficiente de las fases de una emergencia sanitaria causada por influenza aviar.

El protocolo indica la toma de muestras para pruebas moleculares, así como la técnica molecular con alta sensibilidad que debe ser utilizada. Puntualizando los laboratorios de referencia apropiados en la planificación de contingencia, son laboratorios de red mundial del centro de referencia de la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OMSA) para detección del virus (AGROCALIDAD, 2023).

3.7.2. Protocolo Nacional de diagnóstico

Las muestras remitidas serán analizadas a través de la prueba ELISA competitivo como screening, las muestras positivas a esta prueba serán analizadas para la sub tipificación de Influenza A (H5 y H7) mediante la técnica de Inhibición de la Hemaglutinación (HI). En el caso de que las muestras resulten positivas a HI, pasan a

la prueba RT- PCR tiempo real, como prueba confirmatoria. El Laboratorio de la Agencia para realizar la genotipificación del virus establecerá contacto con los Laboratorios Internacionales de referencia (FITO & ZOOSANITARIO, 2020).

3.7.3. Protocolo de Bioseguridad (Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades)

Se recomienda utilizar el siguiente Equipo de protección personal (EPP): Gafas de seguridad (sin ventilación o con ventilación indirecta) que se ajusten correctamente ,guantes desechables, botas de goma (o botas impermeables que pueden desinfectarse) o protectores de calzado, un respirador N95 si hay disponible; si no hay disponible, una mascarilla bien ajustada (p. ej., una mascarilla quirúrgica). Mamelucos desechables y resistentes a líquidos, y protector desechable para la cabeza o el cabello (AGROCALIDAD, 2023).

3.8. Análisis estadístico

La presente investigación utilizará estadística integral que combina análisis descriptivo e inferencial para examinar los datos recopilados en el estudio de detección de influenza aviar A(H5), mediante el software estadístico STATGRAPHICS CENTUTION 19.

Se realizará un análisis descriptivo para caracterizar las variables fisiológicas de interés (sexo, peso corporal, edad, frecuencia respiratoria, frecuencia cardíaca, temperatura corporal) de los albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*) muestreados.

Este análisis proporcionará información esencial sobre la distribución y variabilidad de los datos mediante obtención de medidas como la media, desviación estándar, rango y el coeficiente de variación.

El coeficiente de variación (CV) es una medida relativa de la dispersión de los datos alrededor de la media, expresada como un porcentaje.

Se calcula aplicando la siguiente ecuación:

$$CV = \frac{Sd}{\bar{x}} * 100$$

Ecuación 1. Cálculo de Coeficiente de Variación

En dónde:

Sd= desviación estándar

\bar{x} = media

Un CV alto indica una mayor dispersión de los datos, mientras que un CV bajo indica una menor dispersión. Esta información será importante para comprender la diversidad fisiológica presente en la población de albatros.

Además, se llevará a cabo un análisis de estadística inferencial para explorar posibles relaciones entre las variables fisiológicas y considerar la influencia de factores ambientales y biológicos en la detección de la influenza aviar A(H5).

Se emplearán pruebas de correlación de Pearson (r) para explorar las relaciones entre las variables medidas en la colonia de albatros, permitiéndonos identificar las variables fisiológicas que muestran una asociación significativa entre sí.

El coeficiente de Pearson (r) es una medida estadística que indica la fuerza y la dirección de la relación lineal entre dos variables: si es positivo, indica una relación directa, si es negativo una relación inversa, y su magnitud indica la fuerza de la relación.

Si su valor es más cercano a 1 o -1 indica una correlación más fuerte, un valor positivo indica una correlación positiva, mientras que un valor negativo indica una correlación negativa.

Para su cálculo se aplica la siguiente ecuación:

$$r = \frac{\sum[(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sqrt{\sum[(x_i - \bar{x})^2] \sum[(y_i - \bar{y})^2]}}$$

Ecuación 2. Cálculo del Coeficiente de Correlación de Pearson

En donde:

r: coeficiente de correlación de Pearson

x_i, y_i : son las observaciones de las dos variables

\bar{x}, \bar{y} : son las medias de las dos variables

CAPÍTULO IV

Resultados y discusión

4.1. Resultados

En el presente estudio se analizaron muestras de hisopado traqueal-coana y cloacal de los albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*). Las muestras fueron procesadas en el Laboratorio “LabGal”, siendo este una entidad avalada por el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública de Referencia (INSPI). Se realizaron pruebas para detección de influenza aviar mediante el método AIV-qPCR, las cuales arrojaron resultados negativos.

Tabla 4. Base de datos de albatros muestreados, variables fisiológicas y resultados de la prueba RT-qPCR

Anillo	Sexo	Peso (kg)	Edad	Temperatura (°C)	Frecuencia cardiaca (lpm)	Frecuencia respiratoria (rpm)	Resultados de análisis de laboratorio RT-qPCR	Observaciones en campo
5225	M	4,30	A	39,00	29	6	NEGATIVO	
1019	M	3,80	A	40,40	23	4	NEGATIVO	
1798	H	3,20	A	40,70	29	5	NEGATIVO	
6192	H	4,05	A	30,00	22	4	NEGATIVO	
1313	M	3,60	A	38,30	24	4	NEGATIVO	
1391	H	3,60	A	40,90	24	4	NEGATIVO	
1807	H	3,30	A	40,50	30	6	NEGATIVO	
1445	H	3,05	A	39,10	22	5	NEGATIVO	
1386	M	3,40	A	39,70	28	6	NEGATIVO	
1136	M	X	A	38,70	29	4	NEGATIVO	Sangrado
1465	H	2,95	A	39,30	23	4	NEGATIVO	
2076	M	4,20	A	39,40	27	5	NEGATIVO	
2100	H	3,50	A	40,50	22	5	NEGATIVO	
1616	H	3,60	A	39,80	29	6	NEGATIVO	Ojo derecho cerrado
1223	H	3,10	A	39,20	22	4	NEGATIVO	
1824	H	3,20	A	38,20	27	4	NEGATIVO	
1416	M	3,90	A	39,70	21	4	NEGATIVO	
1981	H	3,60	A	39,10	24	4	NEGATIVO	
1262	H	4,05	A	40,10	25	4	NEGATIVO	
1779	H	3,60	A	39,80	24	5	NEGATIVO	
1369	M	4,50	A	39,20	23	5	NEGATIVO	
5480	H	4,05	A	39,10	24	6	NEGATIVO	

1836	H	X	A	39,00	23	4	NEGATIVO	Vomito
1870	M	3,60	A	39,90	25	6	NEGATIVO	
2062	H	4,05	A	39,10	22	5	NEGATIVO	
2105	M	4,90	A	39,10	24	3	NEGATIVO	
2035	H	4,50	A	40,70	25	4	NEGATIVO	
2001	M	4,20	A	39,10	29	4	NEGATIVO	
1797	M	4,60	A	41,20	24	4	NEGATIVO	
1211	H	3,70	A	39,60	25	5	NEGATIVO	

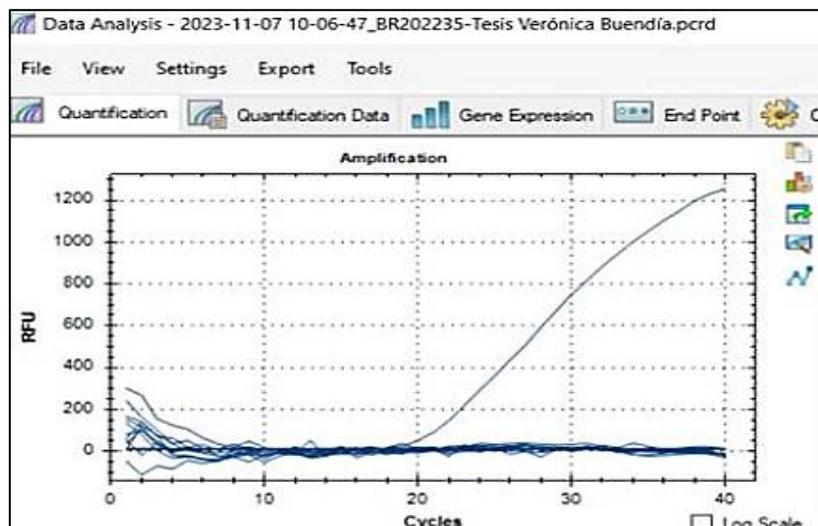
(Buendía, 2024)

En la tabla 4 se presenta la información de los albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*) de galápagos muestreados. Las filas corresponden a la identificación de cada individuo mediante marcaje por anillos, mientras que las columnas representan a las variables fisiológicas como sexo (hembra(H) y macho(M)), el peso corporal (kg), la edad: (adultos (A)), temperatura corporal (° C), frecuencia cardíaca (lpm) y frecuencia respiratoria (rpm), resultado de la prueba RT-qPCR y algunas observaciones relevantes del muestreo.

Si bien todas las 30 muestras analizadas fueron negativas para influenza aviar, se observaron signos clínicos preocupantes en algunos individuos de la colonia, como vómito, ojo cerrado y sangrado. Aunque estos síntomas no se asocian de forma directa con la influenza aviar, su aparición sugiere una evaluación más profunda para determinar su causa y posibles consecuencias para la salud de la población.

4.1.1. Muestra de cloaca

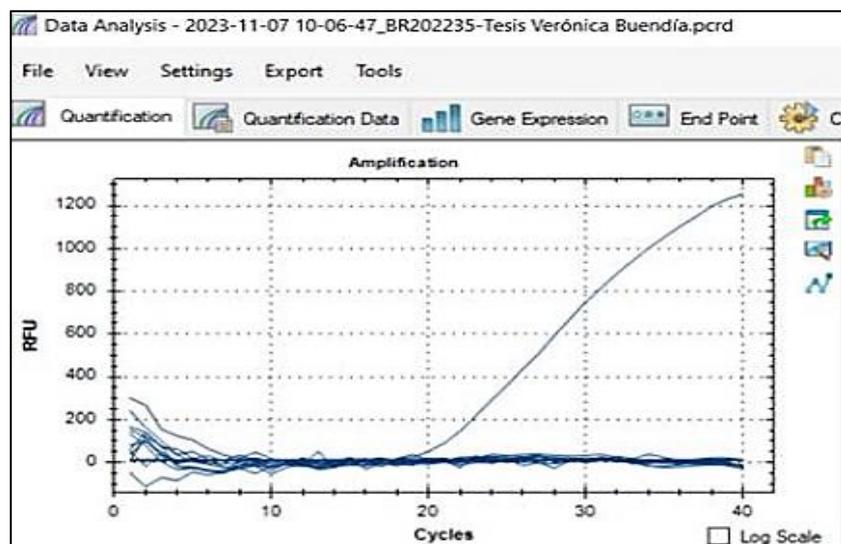
Imagen 1. Curva de amplificación por RT-qPCR de la muestra de cloaca.



La imagen 1, muestra la distribución de los resultados de PCR para la detección de la influenza aviar de 30 muestras cloacales. En el eje X se observa el número de ciclos de PCR necesarios para amplificar el ARN del virus, y en el eje Y se observa la frecuencia de las muestras con un determinado número de ciclos de PCR. Se identifica un único pico en la derecha, lo que representa el control positivo de la muestra. La ausencia de picos indica que no se detectó ARN del virus en ninguna de las muestras analizadas, lo que refleja los resultados negativos de 100% para la influenza aviar.

4.1.2. Muestra de tráquea-coana

Imagen 2. Curva de amplificación por RT-qPCR de la muestra de tráquea



La imagen 2, muestra la distribución de los resultados de PCR para la detección de la influenza aviar de 30 muestras traqueales. En el eje X se observa el número de ciclos de PCR necesarios para amplificar el ARN del virus, y en el eje Y se observa la frecuencia de las muestras con un determinado número de ciclos de PCR. Se puede ver un único pico en la derecha, indicativo del control positivo de la muestra. La ausencia de picos indica que no se detectó ARN del virus en ninguna de las muestras analizadas.

Es fundamental mencionar que la prueba RT-qPCR es una técnica molecular que se destaca como una prueba confirmatoria por su alta sensibilidad y especificidad, lo que significa que ofrece un diagnóstico preciso y confiable.

4.1.3. Análisis de estadística descriptiva

Tabla 5. Resumen estadístico de características fisiológicas tomadas en campo

	SEXO	PESO	Temp_Corp	Frec_Card	Frec_Resp
Count	30	30	30	30	30
Average	0,6	3,53667	39,28	24,9333	4,63333
Standard deviation	0,498273	1,07807	1,90813	2,66437	0,850287
Coeff. of variation	83,0455%	30,4826%	4,85777%	10,686%	18,3515%
Minimum	0	0	30,0	21,0	3,0
Maximum	1,0	4,9	41,2	30,0	6,0
Range	1,0	4,9	11,2	9,0	3,0
Std. skewness	-0,961637	-5,39343	-9,25502	1,27184	1,01357
Std. kurtosis	-2,18012	7,52597	22,9366	-1,07524	-0,954255

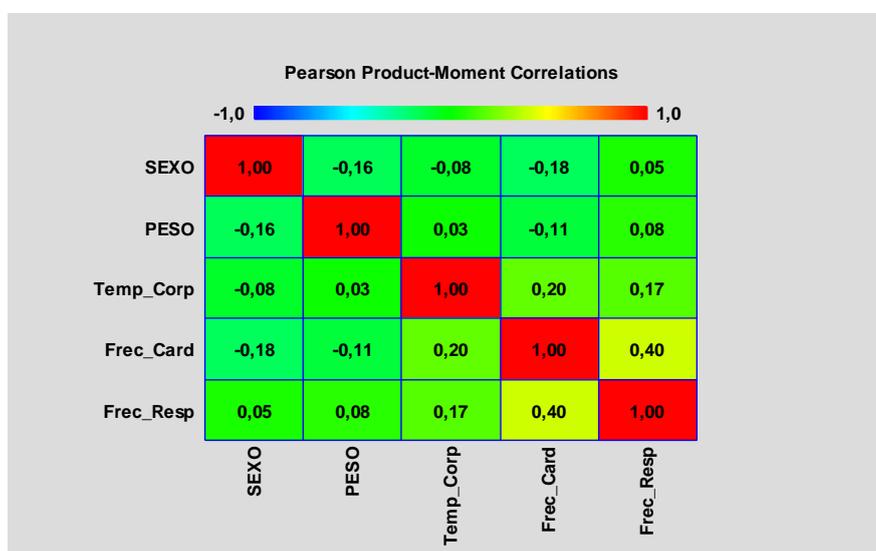
En la tabla 5, se puede ver las características fisiológicas relevantes para la comprensión de la salud de la especie estudiada. En donde sexo fue utilizado como variable binaria (0 y 1), en donde 0 representa los machos y 1 a las hembras, el peso fue medido en (kg), Temp Corp representa a la temperatura corporal (°C), Frec_Card es la frecuencia cardíaca (lpm), Frec_resp es la frecuencia respiratoria (lpm) junto con un resumen de la estadística descriptiva de las variables que tiene un mayor impacto en la salud de los albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*), en donde se obtuvo una media de peso registrada (3,53 kg) junto con una desviación estándar relativamente baja (1,07 kg) y un coeficiente de variación moderado (30,48 %) indican una consistencia en la masa corporal de los albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*), lo que sugiere un estado general de salud y nutrición adecuados. Además, la temperatura corporal promedio (39,28 °C) dentro de un rango normal para aves de esta especie, junto con una desviación estándar y coeficiente de variación moderados (1,90 °C y 4,85 % respectivamente), apunta hacia una estabilidad térmica que es vital para

el funcionamiento fisiológico óptimo. Por otro lado, las mediciones de la frecuencia cardíaca (4,63 lpm) y la frecuencia respiratoria (24,94 rpm) proporcionan una evaluación directa de la función cardiovascular y respiratoria de las aves.

Aunque todos los resultados fueron negativos en cuanto a la presencia de influenza aviar, el análisis detallado de estas variables fisiológicas contribuye significativamente a nuestra comprensión del estado de salud y bienestar de los albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*) estudiados, proporcionando una línea de base importante sobre la salud aviar y la conservación en el archipiélago de Galápagos.

Además, es importante mencionar que la variable temperatura corporal tiene una baja variabilidad (CV = 4,85 %), lo que indica que, la mayoría de los albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*) tienen una temperatura corporal similar, esta homogeneidad dificulta la identificación de diferencias significativas entre grupos o categorías de aves. Es importante tener en cuenta que la temperatura corporal puede estar influenciada por una variedad de factores ambientales, como la temperatura exterior, hora del día, entre otros.

Imagen 3. Correlación de Pearson de las características fisiológicas de las muestras



En la imagen 3, se puede observar la matriz de Correlación de Pearson, que permite analizar relaciones significativas entre las variables fisiológicas, que permiten determinar la salud general de los albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*) y detectar posibles signos de enfermedad. Existe una correlación positiva moderada entre la temperatura corporal y la frecuencia cardíaca ($r = 0,20$), esto significa que un aumento en la TC podría estar asociado con un incremento en la temperatura respiratoria, siendo un indicador de la respuesta adaptativa a cambios en el entorno como por ejemplo el fenómeno de El Niño o factores de estrés.

De igual manera tenemos una correlación positiva fuerte entre la frecuencia respiratoria y la frecuencia cardíaca ($r = 0,40$), lo que sugiere una relación directa entre las variables cardiovasculares de los albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*), lo que podría indicar su estado de salud general y su capacidad para enfrentar desafíos como enfermedades y cambios en el entorno.

Es relevante mencionar que el estado epidemiológico de los albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*) parece ser favorable en términos de influenza aviar, la falta de correlaciones fuertes entre las variables estudiadas, junto con la ausencia de datos positivos utilizando la técnica molecular RT-qPCR, indican que el riesgo dentro de la colonia es bajo.

4.2. Discusión

El presente estudio se llevó a cabo para determinar la presencia del virus de influenza aviar A(H5) en una colonia de albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*) mediante la técnica molecular RT-qPCR, garantizando que el procedimiento utilizado en el ensayo permita la detección segura del subtipo de virus. Según (Grätz et al., 2022) indica que esta técnica cuantitativa permite la medición precisa de ARN viral mediante la amplificación de ADN complementario en una reacción de PCR. Una de sus ventajas es la capacidad de determinar el número de copias en una secuencia de ADN específica, en este caso, el virus de influenza aviar. El aislamiento de la muestra es crucial para obtener resultados confiables. Nuestros resultados fueron negativos en los 30 albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*) muestreados, confirmando la especificidad y sensibilidad de la prueba, una herramienta importante para la vigilancia epidemiológica en aves.

Según el artículo (Gregorova et al., 2022) menciona que diferentes acciones antrópicas representan una amenaza significativa para las poblaciones de especies en Galápagos. Esta compleja dinámica ha elevado a estas especies a categorías de amenaza dentro de la red UICN, lo que ha generado un estado de alerta para el monitoreo y seguimiento constante. El objetivo no es solo controlar la disminución de ejemplares, sino también vigilar la aparición de patógenos que puedan afectar a las especies, provenientes de factores ambientales externos. De la misma manera, se busca garantizar la preservación a largo plazo de las especies en Galápagos.

El estudio realizado por (Jiménez-Uzcátegui G. et al., 2021) considera que el estado de salud de las aves se ve influenciado por diversos parámetros fisiológicos, como el sexo, edad, ritmo cardíaco, frecuencia respiratoria, temperatura cloacal, peso corporal, longitud del tarso y longitud del ala. Estos datos no se habían adquirido con anterioridad para el control de enfermedades infecciosas y no infecciosas. En este artículo, se analizaron los albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*), que, por presentar rasgos mencionados, demostraron tener un buen estado de salud. Además, en nuestro estudio se evidenció que, en efecto, las variables fisiológicas son indicadoras del buen estado de salud de las aves de interés, lo que sugiere que esta especie puede ser susceptible al virus, pero no son inmunes a enfermedades virales.

CAPÍTULO V

Conclusiones y recomendaciones

5.1. Conclusiones

✓ La delimitación de la zona fue mediante un método combinado de muestreo estratificado y transeptos lineales, el cual fue eficiente y replicable, dando cobertura uniforme al área, permitiendo una optimización de captura y marcaje de la colonia de albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*).

✓ La caracterización de los parámetros fisiológicos de los 30 albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*) muestreados incluyó sexo, ya que en muchas especies de aves existen diferencias sexuales en términos de tamaño, comportamiento y susceptibilidad a enfermedades, por lo que es importante considerar el sexo de las aves al caracterizar su estado de salud, ya que podría haber diferencias en la exposición a factores de estrés, patrones de comportamiento, etc.; el peso corporal es un indicador importante en la salud y el estado nutricional de las aves. El peso anormalmente bajo o alto puede ser indicativo de problemas de salud, como desnutrición, enfermedades metabólicas o infecciosas, o cambios en el hábitat y el suministro de alimentos; la temperatura corporal, debido a que es un indicador clave del metabolismo y la regulación térmica de las aves, cambios anormales en la TC pueden ser señales de infección, inflamación y otros trastornos médicos; frecuencia respiratoria, que puede variar en respuesta a la actividad física, la temperatura ambiente, el estrés y las enfermedades respiratorias. Un aumento en la frecuencia respiratoria puede indicar dificultades respiratorias, infecciones respiratorias u otros problemas de salud. La frecuencia cardíaca, ya que al igual que la frecuencia respiratoria, es un indicador de

estrés, enfermedad cardiovascular u otros trastornos médicos en las aves. Estas variables proporcionan una información valiosa del estado de la colonia y ofrece la posibilidad de detectar enfermedades en etapas tempranas.

✓ La aplicación de la técnica molecular de hisopado RT-qPCR para la detección de influenza aviar en una colonia de albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*), nos dio resultados negativos en las 30 muestras analizadas. A pesar de la ausencia de detección del virus en muestra, la sensibilidad y especificidad de la técnica subrayan su eficiencia como herramientas de diagnóstico altamente fiables.

Los resultados negativos son alentadores y sugieren un estado epidemiológico favorable en la población de albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*) estudiada en términos de influenza aviar en el momento de la investigación. Sin embargo, es importante destacar que la vigilancia continua y el monitoreo epidemiológico son fundamentales para detectar la presencia del virus en etapas tempranas y tomar medidas preventivas eficaces para proteger la salud de las aves y prevenir la propagación de la enfermedad tanto en las poblaciones de aves como en la población humana.

5.2. Recomendaciones

Mantener una supervisión continua y un monitoreo periódico de la salud aviar para detectar cualquier variación o tendencia preocupante que pueda surgir a futuro, con el propósito de salvaguardar la salud de las aves endémicas del archipiélago de Galápagos.

Fomentar colaboración con investigadores de diferentes disciplinas, como la biotecnología, virología, ecología y la conservación, para afrontar de manera integral desafíos relacionados a la salud de los albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*), y otras aves marinas de las islas.

Plantear una alternativa biotecnológica que emplee herramientas de bioinformática para la secuenciación del virus y llevar un seguimiento de los cambios genéticos o mutaciones. Asimismo, analizar la microbiota del albatros para conocer la composición microbiana, que influyen en el metabolismo, sistema inmunológico y la resistencia a enfermedades.

Divulgar los hallazgos de manera transparente y accesible con la comunidad científica, para contribuir a la toma de decisiones y actividades de conservación efectivas.

Bibliografía

- Adlhoch, C., Fusaro, A., Gonzales, J. L., Kuiken, T., Mirinaviciute, G., Niqueux, É., Stahl, K., Staubach, C., Terregino, C., Broglia, A., Kohnle, L., & Baldinelli, F. (2023). Avian influenza overview March – April 2023. *EFSA Journal*, 21(6). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8039>
- Agencia de la regulación y control de la bioseguridad y carentena de Galápagos. (2022). *Resolución N°040-De-Abg-2022*.
- AGROCALIDAD. (2022). Resolución 0040. Plan de Contingencia para Influenza Aviar. *Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca*, 94. <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2022/11/Resolucion-040-plan-contingencia-Influenza-Aviar.pdf>
- AGROCALIDAD. (2023). *Guía-Técnica-Influenza-Aviar.Pdf*.
- Alto, R., & Moderado, R. (2023). *Información de contexto Evaluación de la amenaza*. 1–7.
- Angeletti, V., & Yantorno, M. L. (2023). Gripe aviar: la nueva amenaza. *Actualizaciones En Sida e Infectología*, 31(111), 6–9. <https://doi.org/10.52226/revista.v31i111.181>
- Baumberger, C., Lazo, A., Jimenez-Bluhm, P., Di Pillo, F., Bravo-Vasquez, N., & Hamilton-West, C. (2018). Detection of Newcastle disease virus in backyard poultry in Chile. *Revista MVZ Cordoba*, 23, 6942–6950. <https://doi.org/10.21897/RMVZ.1414>
- Cabascango Martínez, L. V. (2023). Influenza aviar y su impacto en la avicultura ecuatoriana. *Anatomía Digital*, 6(2), 37–49. <https://doi.org/10.33262/anatomiadigital.v6i2.2520>
- Cabrera, D., & Cabrera, L. (2021). *Sostenibilidad en las Islas Galápagos : Equilibrio ambiental y social*.
- Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. (2023). Informe técnico: Virus de la influenza aviar A (H5N1) altamente patógena . *Informe Técnico: Virus de La Influenza Aviar A (H5N1) Altamente Patógena* , 1–11. https://espanol.cdc.gov/flu/avianflu/spotlights/2022-2023/h5n1-technical-report_june.htm
- Cui, H., Che, G., de Jong, M. C. M., Li, X., Liu, Q., Yang, J., Teng, Q., Li, Z., & Beerens, N. (2022). The PB1 gene from H9N2 avian influenza virus showed high compatibility and increased mutation rate after reassorting with a human H1N1 influenza virus. *Virology Journal*, 19(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12985-022-01745-x>
- De Jesús Coria-Lorenzo, J., Sierra-Calle, A. E., Guerrero-Mendoza, G., & Field-Cortázar, J. (2019). Influenza and avian viruses: The latent threat of a new pandemic virus. *Acta Pediátrica de México*, 40(3), 154–165. <https://doi.org/10.18233/APM40No3pp154-1651812>
- De la Peña, M. (2018). Manual de enfermedades de las aves. *Santa Fe [Argentina] Colmegna*, 4(11), 23–32. <https://www.fcv.unl.edu.ar/aves/wp-content/uploads/sites/16/2020/06/ManualEnfermedadesAves.pdf>
- EPI-Ecuador. (2022). *Compendio de Contenidos Esenciales sobre Biodiversidad Marina y Terrestre para la Contextualización Curricular con enfoque de Sostenibilidad para Galápagos*. 50. https://ecosecuador.org/wp-content/uploads/2022/11/Compendio-para-docentes-Biodiversidad-Galapagos_compressed.pdf
- Escalante, S. (2021). *Modelado de nicho ecológico para caracterizar la expansión del género Lonchura en México*. 1–130.
- Fe, S. (2012). *De Muestras De Granito-Gneis*. 6–11.
- FITO, A. D. R. Y. C., & ZOOSANITARIO. (2020). Agrocalidad Normativa. In *Sanidad Animal* (p. 10). <https://www.agrocalidad.gob.ec/wp-content/uploads/2020/05/8-Enfermedades-de-declaracion-C.pdf>

- Fondo de Inversión Ambiental Sostenible, 2018. (2018). *Plan de Manejo de Especies Invasoras para Galapagos (2019-2029)*. 191.
- Freile, J. F., Santander, T., Jiménez-Uzcátegui, G., Carrasco, L., Cisneros-Heredia, D., Guevara, E., Sánchez-Nivicela, M., & Tinoco, B. (2019). Lista Roja De Las Aves del Ecuador. In *Ministerio del Ambiente, Aves y Conservación, Comité Ecuatoriano de Registros Ornitológicos, Universidad del Azuay, Red Aves Ecuador y Universidad San Francisco de Quito*.
- Grätz, C., Bui, M. L. U., Thaqi, G., Kirchner, B., Loewe, R. P., & Pfaffl, M. W. (2022). Obtaining Reliable RT-qPCR Results in Molecular Diagnostics—MIQE Goals and Pitfalls for Transcriptional Biomarker Discovery. *Life*, 12(3). <https://doi.org/10.3390/life12030386>
- Gregorova, P., Heinonen, M. M. K., & Sarin, L. P. (2022). An improved RT-qPCR method for direct quantification of enveloped RNA viruses. *MethodsX*, 9(February), 101737. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2022.101737>
- Jiménez-uzcátegui, G. (2018). *Galápagos. September*.
- Jiménez-Uzcátegui, G., Carrera-Játiva, P. D., Sarzosa, S., Encalada, E., Rodríguez-Hidalgo, R., Crook, E., & Sevilla, C. (2021). Normal physical parameters characterizing galapagos marine birds. *Marine Ornithology*, 49(2), 257–263.
- Jiménez-Uzcátegui, G., Wiedenfeld, D., Valle, C. A., Vargas, H., Piedrahita, P., Muñoz-Abril, L. J., & Alava, J. J. (2019). Threats and Vision for the Conservation of Galápagos Birds. *The Open Ornithology Journal*, 12(1), 1–15. <https://doi.org/10.2174/1874453201912010001>
- Jiménez-Uzcátegui, J., Freile, J. F., Santander, T., Carrasco, L., Cisneros-Heredia, D. F., Guevara, E. A., & Tinoco, B. A. (2018). *Lista roja de las aves de Galápagos. January*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.12195.20006>
- Kozdruń, W., Czekaj, H., & Styś, N. (2015). Avian zoonoses - A review. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 59(2), 171–178. <https://doi.org/10.1515/bvip-2015-0026>
- Lado, L., Tutores, P., Aguilar, N., Fern, M., & Laguna, L. (2018). *familia Balaenopteridae en las Islas Canarias en base a datos de ciencia cívica (Red CetAVist). Spatial modelling of the distribution of the family Balaenopteridae in the Canary Islands based on data from civic science (Red CetAvist). AUTORA : Lidia L.*
- Lorenzoni, G., & Domínguez, D. (2021). Bronquitis Infecciosa en Pollos. *PennState Extension*.
- MAE. (2015). Ley para la Conservación y uso sustentable de la Biodiversidad. *Registro Oficial*, 399–431. http://www.vertic.org/media/NationalLegislation/Ecuador/EC_Ley_de_Biodiversidad.pdf
- María, O., & Mellado, D. (2020). III. Número 30. *Septiembre, 2020*, 88–111.
- Morano, P., Tajani, F., Di Liddo, F., & Darò, M. (2021). Economic evaluation of the indoor environmental quality of buildings: The noise pollution effects on housing prices in the city of Bari (Italy). *Buildings*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/buildings11050213>
- Muñoz, G., Rosero, C., Vidal, F., & Soffe, J. (2022). *Lineamientos Operativos Abordaje Para Brotes De Influenza Estacional*. 1–34.
- Nevone, A., Lattarulo, F., Russo, M., Panno, G., Milani, P., Basset, M., Avanzini, M. A., Merlini, G., Palladini, G., & Nuvolone, M. (2023). A Strategy for the Selection of RT-qPCR Reference Genes Based on Publicly Available Transcriptomic Datasets. *Biomedicines*, 11(4), 1–21. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11041079>
- Padilla Noriega, R., Aburto Fernández, E., Fraire Cachón, M., & Padilla Noriega, L. (2004). Artículos científicos Influenza aviar: histopatología y detección viral por. *Veterinaria México*, 35, 1–18.
- Rani, P., Chakraborty, M. K., Sah, R. P. R. P. R. P., Subhashi, A., Disna, R., UIP, P., Chaudhary, D. P., Kumar, A. A. A. A. A., Kumar, R. R., Singode, A., Mukri, G., Sah, R. P. R. P. R.

- P., Tiwana, U. S., Kumar, B., Madhav, P., Manigopa, C., Z, A. H., Anita, P., Rameshwar, P. S., ... Kumar, A. A. A. A. A. (2020). No Title الأنا والآخر ودوي الغرب. *Range Management and Agroforestry*, 4(1), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2017.06.020>
- Resoluciones, E., Regulaci, A. D. E., Bioseguridad, C. D. E. L. A., Gal, C. P., Transparencia, D. E., Social, C., Bancos, S. D. E., & Asociadas, I. (2024). *Año II - N° 475 - 52 páginas Quito, jueves 11 de enero de 2024.*
- Simancas-Racines, A., Cadena-Ullauri, S., Guevara-Ramírez, P., Zambrano, A. K., & Simancas-Racines, D. (2023). Avian Influenza: Strategies to Manage an Outbreak. *Pathogens*, 12(4), 1–17. <https://doi.org/10.3390/pathogens12040610>
- Williams, R. A. J., Sánchez-Llatas, C. J., Doménech, A., Madrid, R., Fandiño, S., Cea-Callejo, P., Gomez-Lucia, E., & Benítez, L. (2023). Emerging and Novel Viruses in Passerine Birds. *Microorganisms*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092355>
- World Organisation for Animal Health (WOAH). (2023). *WOAH Resolution N. 28 Strategic challenges in the global control of high pathogenicity avian influenza CONSIDERING THAT*. 28, 1–3.
- Zooprofilattico, I., Delle, S., Union, E., Avian, F. O. R., & Disease, N. (2007). *European Union Reference Laboratory for Avian Influenza and Newcastle Disease Sop Imm 065 Detection of Antibodies To Newcastle Disease Virus By*. 01, 1–8.

Anexos

Anexo 1. Captura de albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*)

Créditos: (Buendía, 2024)



Anexo 2. Albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*) capturado

Créditos: (Buendía, 2024)



Anexo 3. Marcaje de albatros de las Galápagos

Créditos: (Vaca, 2024)



Anexo 4. Muestreo mediante hisopado estéril de albatros de las Galápagos (*Phoebastria irrorata*), realizado por Verónica Buendía.

Créditos: (Coloma, 2023)



Anexo 5. Materiales para el muestreo en campo.

Créditos: (Buendía, 2024)



Anexo 6. Laboratorio LabGal, lugar donde se procesaron las muestras

Créditos: (Buendía, 2024)



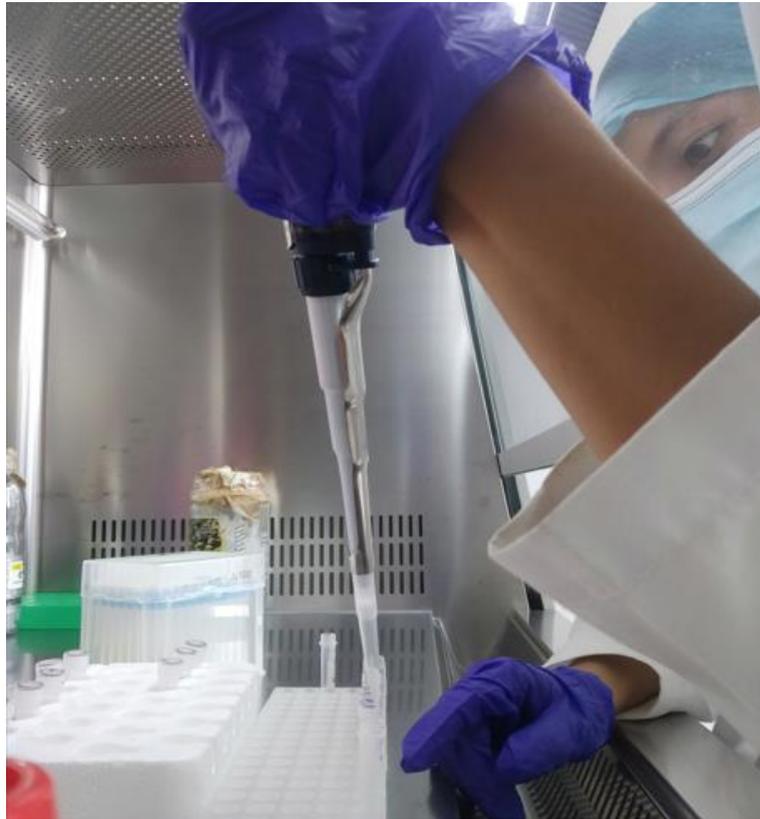
Anexo 7. Muestras de hisopado en los criotubos

Créditos: (Buendía, 2024)



Anexo 8. Extracción de ARN (virus de influenza aviar)

Créditos: (Buendía, 2024)



Anexo 9. Ciclo de amplificación de la PCR - Termociclador BIO - RAD

Créditos: (Buendía, 2024)

