



Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC)

JCCM - UCLM- CSIC

MASTER UNIVERSITARIO EN INVESTIGACIÓN BÁSICA Y APLICADA

EN RECURSOS CINEGÉTICOS

TRABAJO FIN DE MÁSTER

**LOS CENTROS DE RECUPERACIÓN COMO PUNTOS DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA:
EL CASO DE LA CIGÜEÑA BLANCA (*Ciconia ciconia*)**



Alumno: María Cruz Camacho Sánchez- Camacho

Director: Úrsula Höfle Hansen

Año: 2012-2013

**LOS CENTROS DE RECUPERACIÓN COMO PUNTOS DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA:
EL CASO DE LA CIGÜEÑA BLANCA (Ciconia ciconia)**

VºBº Úrsula Höfle Hansen	VºBº María Cruz Camacho Sánchez- Camacho

- 1. RESUMEN**
- 2. INTRODUCCIÓN**
- 3. HIPÓTESIS**
- 4. OBJETIVOS**
- 5. MATERIAL Y MÉTODOS**
 - 5.1 Área de estudio**
 - 5.2 Ejemplares muestreados**
 - 5.3 Toma de muestras**
 - 5.4 Análisis de las muestras**
- 6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**
- 7. RESULTADOS**
- 8. DISCUSIÓN**
- 9. AGRADECIMIENTOS**
- 10. BIBLIOGRAFÍA**

RESUMEN

El 75% de los nuevos patógenos en humanos son zoonóticos. La vigilancia y el seguimiento son fundamentales para identificar la presencia de patógenos en humanos, animales domésticos y en fauna silvestre. En este último caso, la vigilancia se puede llevar a cabo mediante la recogida de muestras de animales enfermos o muertos que son trasladados a los centros de recuperación de fauna silvestre. Así, los centros de recuperación pueden ser un recurso muy valioso para la vigilancia y el seguimiento de la actividad de determinados patógenos sobre la fauna silvestre.

España alberga una de las poblaciones más importantes de Cigüeña Blanca de Europa. Mediante la elaboración de censos, se observó un descenso importante de la población hasta 1984, momento en el que comienza un incremento considerable en el número de ejemplares y que se ha atribuido al aumento de basureros urbanos, los cuales aportan una importante fuente de alimento para ésta y otras especies. Esta fuente antropogénica hace que estos animales entren en contacto con patógenos y varios agentes contaminantes.

En este estudio se compararon prevalencias de *E. coli* y *Salmonella spp.*, de anticuerpos frente a virus West Nile, Influenza aviar y enfermedad de Newcastle, y patrones de antibiorresistencias en *E. coli* de cigüeñas silvestres establecidas en diversos hábitats naturales con las obtenidas en individuos admitidos a centros de recuperación.

Las prevalencias observadas en los individuos admitidos a centro de recuperación eran similares a las del conjunto de la población silvestre. Sin embargo, cuando las poblaciones silvestres se separan según el hábitat de localización de las colonias, las prevalencias son más similares a las de las colonias asociadas a vertedero y significativamente mayores que en las colonias de hábitats más naturales.

Futuros estudios deben dilucidar si las cigüeñas que se reciben en los CRFS proceden de colonias asociadas a vertederos o si la asociación observada se debe a las consecuencias del estado inmune comprometido de las cigüeñas accidentadas.

Palabras clave: Antibiorresistencias, centro de recuperación de fauna silvestre, cigüeña blanca, enterobacterias, vertederos, vigilancia sanitaria, virus.

INTRODUCCIÓN

La vigilancia y el seguimiento son fundamentales para identificar la presencia de patógenos en la fauna silvestre. Esta vigilancia puede realizarse mediante la recogida de animales enfermos o muertos, por parte de personal especializado o del público en general (vigilancia pasiva o descriptiva). La falta de rutina durante la recogida de muestras puede dar como resultado una subestimación de ocurrencia de patógenos o retrasos en la detección (Eidson, 2001). A veces, la vigilancia se lleva a cabo mediante la búsqueda de un determinado patógeno sobre una población específica (vigilancia activa). Esta forma ha sido identificada como una de las mejores para la detección temprana en animales silvestres (Stallknecht, 2007; Stitt et al., 2007). Sin embargo, la aplicación de programas de vigilancia específica y sistemática en las poblaciones en libertad y durante largos períodos es costoso (Eidson, 2001), ya que implica muchas veces la captura de animales y la actuación de personal muy especializado.

Los centros de recuperación de fauna silvestre (CRFS) pueden ser un recurso muy valioso para la vigilancia y el seguimiento de la prevalencia de determinados patógenos sobre la fauna silvestre. Stitt et al. (2007) documentaron que los CRFS recibían la más amplia variedad de taxones de la mayor área geográfica y que la actividad de ciertos patógenos podría ser más probable que se detectase en estos centros, porque estas instalaciones reciben regularmente fauna silvestre enferma o con ciertas lesiones, que la hacen más susceptible a padecer enfermedad (Wobeser, 2006). Así, otros estudios examinan la morbilidad y la mortalidad en los centros de rehabilitación de la fauna y sugieren que estas instalaciones pueden ser útiles para la vigilancia de enfermedades de vida silvestre (Wendell et al., 2002; Kelly y Sleeman, 2003; Nemeth et al., 2008; Molina- López et al., 2011).

En un país como España, que dispone de un gran número de CRFS, podría aprovecharse tal ventaja para constituir una potente herramienta en el seguimiento de determinados patógenos de riesgo. El estudio de patógenos de

potencial zoonótico en especies ampliamente distribuidas por la geografía española, podría permitir determinar si esta herramienta sería también de utilidad en nuestro país.

La cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*) es una especie ampliamente distribuida en Europa. España alberga una de las poblaciones más importantes junto con las de Polonia y Ucrania (Tucker & Evans, 1997; Schulz, 1999), alcanzándose las mayores densidades en la parte suroeste, al preferir temperaturas suaves y escasas precipitaciones, sobre todo en la época de reproducción.

La población de cigüeña blanca en España ha experimentado un aumento considerable en los últimos años (Aguirre et al., 2002; Vergara et al., 2004). Estudios sobre la distribución geográfica, la fenología de invernada y reproducción de la cigüeña blanca en España han demostrado además que la Península Ibérica es el lugar de invernada para muchas cigüeñas procedentes del norte de Europa (Blanco et al., 1997; Tortosa et al., 2002, Vergara et al., 2004).

Sus poblaciones se encuentran asociadas a la vega de los ríos, basureros, zonas de agricultura y ganadería extensiva y dehesas. El aumento en el número de vertederos parece estar relacionado directamente con el aumento de esta población. La facilidad con la que los individuos encuentran comida en estos puntos ha hecho que se establezcan grandes colonias en torno a ellos (Blanco et al. 1997). La utilización de estos lugares como fuente de alimentación, hace que las cigüeñas estén expuestas a diversos contaminantes físicos, químicos y biológicos.

Entre los agentes biológicos a los que se hallan expuestas las cigüeñas se encuentran enterobacterias como *Escherichia coli* (*E.coli*) y *Salmonella spp.* entre otras. Así, se ha conseguido aislar *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* y *Helicobacter canadensis* en muestras intestinales de aves afines a zonas urbanas (Vázquez et al., 2010). Esto hace que las aves sean consideradas como un reservorio de patógenos para el ganado doméstico e incluso para el hombre. Las aves que viven en colonias situadas en espacios naturales también pueden estar expuestas a estos agentes por el contacto con estercoleros y aguas residuales

de ganadería, entre otros, al ser capaz de recorrer grandes distancias para su abastecimiento o en sus movimientos migratorios.

La mayoría de los patógenos humanos (868 especies; 61% del total) son zoonóticos (Woolhouse, 2002). Los patógenos objetos de nuestro estudio han sido seleccionados por la importancia económica y sobre salud pública que tienen para el hombre. Palomo et al. (2013) señala la importancia de vigilar la microbiota intestinal y su resistencia a los antibióticos de los animales silvestres en paralelo a los animales de ganado y los seres humanos.

Escherichia coli.

E. coli es un bacilo gram-negativo, de la familia *Enterobacteriaceae* y género *Escheria* (Gyles, 2004). El género *Escherichia* comprende 5 especies, de las que *E. coli* es la única que produce cuadros clínicos importantes.

E. coli forma parte de la microbiota normal aerobia y anaerobia facultativa, comensal y saprofítica del tracto digestivo de la mayor parte de los mamíferos (Gordon y Cowling, 2003), realizando funciones beneficiosas para el hospedador. Se trata de una bacteria intestinal que se excreta a través de las heces y que es capaz de sobrevivir en el ambiente, por lo que su presencia es considerada como indicador de contaminación fecal.

La clasificación de las distintas cepas de *E. coli* se basa en la determinación de los antígenos somático (O), capsular (K) y flagelar (H). (Kauffman, 1972). Existen numerosas combinaciones O:K:H, pero no todas resultan patógenas.

En aves, determinadas cepas patógenas de *E. coli*, denominados *E. coli* patogénicos aviares (APEC) (Dziva y Stevens, 2008) causan colibacilosis; enfermedad de gran importancia por las enormes pérdidas económicas que ocasiona en avicultura.

Al margen del riesgo sanitario en las explotaciones avícolas, algunos estudios sugieren la existencia de un vínculo entre cepas APEC y determinados cuadros de infecciones del tracto urinario, septicemias y meningitis neonatales en el hombre (Rodríguez-Siek et al., 2005).

Salmonella spp.

Salmonella es un bacilo gram-negativo que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, tanto como comensal como patógeno en el tracto intestinal de mamíferos, aves reptiles e insectos. Se aísla con facilidad en aguas fluviales, suelo e incluso en alimentos.

El principal reservorio de *Salmonella spp.* es el ganado doméstico (Wells et al., 2001), aunque la fauna silvestre también puede jugar un papel importante como reservorio, ya que se han identificado como origen en algunos casos documentados (Khun et al., 2011).

Existen múltiples vías de transmisión, y aunque la más común es la feco-oral, también se han descrito otras como la vía conjuntival, respiratoria o incluso a través de las heridas (Coburn et al., 2006). La principal vía de transmisión al hombre es la ingestión de alimentos contaminados y son causa de las mayoría de las toxiinfecciones. Del mismo modo, los animales silvestres que interaccionan con ganado doméstico, podrían infectarse con este patógeno por contacto con aguas residuales, estiércol u otros residuos de origen animal.

Por otra parte, la cigüeña está expuesta a otros patógenos no relacionados directamente con los residuos urbanos, como son los virus de Influenza aviar, (IA), Newcastle Disease, (ND), y West Nile, (WNV), entre otros. Sin embargo, el potencial efecto del aprovechamiento de residuos humanos sobre el estado inmune de las cigüeñas podría hacer éstas más susceptibles.

VIRUS WEST NILE

WNV es el arbovirus con potencial zoonótico más distribuido mundialmente. Se transmite a través de la picadura de mosquitos, generalmente del género *Culex*, y puede infectar a numerosos hospedadores vertebrados, tanto aves como mamíferos, anfibios y reptiles (Mc Lean y Ubico, 2007). Tiene un ciclo de transmisión natural entre mosquitos y aves, afectando como hospedadores accidentales al hombre, los equinos, y una extensa variedad de mamíferos (Marra et al., 2004).

Las aves silvestres son el reservorio más importante de WNV debido a que desarrollan viremias elevadas que pueden infectar mosquitos y así amplificar el ciclo de transmisión. De forma natural la infección de las aves se produce a través de la picadura de un mosquito infestado (McLean y Ubico, 2007), aunque el contagio directo (Austin et al., 2004) debido al consumo de carroña o presa infestada (Garmendia et al., 2000) también ha sido documentado. En general, se cree que las aves migratorias son agentes dispersores del virus, al coincidir los movimientos migratorios con los movimientos de dispersión viral.

Estudios realizados en el entorno del Parque Nacional de Doñana entre los años 2004 y 2007, han demostrado la presencia de anticuerpos de WNV en varias especies de aves silvestres, siendo la seroprevalencia mayor en aves migratorias sub-saharianas que en aves residentes del sur de España (López et al., 2008). La exposición de la cigüeña blanca a WNV se ha documentado mediante la detección de la presencia de anticuerpos frente a virus WN en pollos de cigüeña blanca procedente del Parque Nacional de Doñana (Figuerola et al., 2007).

NEWCASTLE

El paramixovirus aviar tipo 1 (aPMV-1), que incluye el conocido como virus de la enfermedad de Newcastle, está ampliamente distribuido. Por su distribución mundial y los daños económicos causados en la producción de aves en muchos países, es una de las dos únicas enfermedades aviarias, junto con la IA, incluidas en las listas de notificación obligatoria de la Organización Mundial de la Salud Animal (OIE). Las aves silvestres son el principal reservorio del virus y la fuente de infección de las aves domésticas. En poblaciones silvestres se han reportado casos de mortalidades altas como por ejemplo en el cormorán orejudo (*Phalacrocorax auritus*) en Norteamérica, donde afectó a pollos de un año teniendo un leve impacto en el tamaño de la población (Kuiken, 1998). La paloma bravía (*Columba livia*) sufrió una enzootia causada por un subtipo de NDV (PaPMV-1) específico de palomas que se inició en el Medio Oriente y se extendió a África y Europa, llegando finalmente al resto del mundo (Alexander, 1999).

No existen datos específicos sobre la exposición de cigüeñas blancas a aPMV-1, pero si es conocida su circulación en España, ya que en 2009 se notificó un caso en una granja de aves cinegéticas (OIE, 2009) y regularmente se detecta en rapaces y tórtolas turcas (*Streptopelia decaocto*).

INFLUENZA AVIAR

Los virus de IA pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae*. Los virus que infectan a las aves pertenecen al género Influenza A, clasificándose éstos a su vez según su reacción serológica frente a las glicoproteínas de superficie HA y NA en los test de inhibición de hemaglutinación (HI) y neuraminidasa (NI) (Swayne et al., 1998). Se conocen 16 subtipos HA (H1- H16) y 9 subtipos NA (N1-N9), resultando un total de 144 combinaciones posibles, de las que 103 se han aislado en aves silvestres (Kaleta et al., 2005).

El contacto con las aves silvestres, directo o indirecto, es la principal forma de exposición al virus de las aves domésticas, encontrándose un mayor número de brotes en las áreas geográficas por las que se establecen las principales rutas migratorias, y especialmente en las temporadas de llegada y paso de aves invernantes procedentes del norte de Europa (Pérez-Ramírez et al., 2010).

En un estudio en los humedales de Castilla –La Mancha, se encontró una prevalencia del 1% de virus de Influenza aviar de baja patogenicidad (VIABP). Uno de los casos positivos se consiguió aislar de una muestra de hisopo cloacal en un ejemplar de cigüeña blanca (Pérez-Ramírez et al., 2010). El comportamiento gregario, su alta movilidad entre humedales y ambientes humanizados, y el grado de interacción con otras especies hacen que la cigüeña blanca sea una especie de interés para el estudio de la epidemiología de los VIABP.

El presente trabajo estudia la exposición a varios agentes víricos y bacterianos de las cigüeñas blancas y evalúa la utilidad de los datos de prevalencia obtenidos en CRFS como representación del estado sanitario de las poblaciones silvestres.

HIPÓTESIS

Los animales que llegan a los centros de recuperación reflejan el estado sanitario de las poblaciones silvestres.

OBJETIVOS

Con este TFM se pretende aportar un mayor conocimiento sobre la utilidad de los CRFS como punto de muestreo para la vigilancia de enfermedades en las aves silvestres, utilizando como modelo la cigüeña blanca, y algunos de los patógenos a los que podría estar expuesta.

Los objetivos específicos del estudio son:

1. Comparar la prevalencia de patógenos entre diversas poblaciones de cigüeña blanca y las que llegan a los centros de recuperación.
2. Conocer la prevalencia de patógenos de interés para la conservación de otras especies utilizando como modelo de estudio la cigüeña blanca.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Área de estudio

El área de estudio se localiza en la provincia de Ciudad Real (Figura 1). Ubicada en la mitad sur de la Península Ibérica, su altitud a 629 m y su orografía, hacen que presente una fuerte oscilación térmica anual. Así, presenta un clima mediterráneo continental con inviernos fríos y veranos muy calurosos, con temperaturas medias anuales entre los 13 y 14° C y una precipitación media anual de 438 mm, concentrada especialmente en otoño y primavera.

Ciudad Real, según el último censo realizado por la Sociedad Española de Ornitología (Seo/BirdLife) en 2004, cuenta con cerca de 1.700 parejas de cigüeña blanca, el 4,5 % de la población total para la especie en España.



Figura 1. Área de estudio. Localización de las colonias naturales, de vertedero y CRFS de la provincia de Ciudad Real

Para el estudio se tomaron muestras de cigüeñas blancas silvestres (pollos y adultos) que pertenecían a colonias de diferentes emplazamientos (Figura 1), con distinto grado de exposición a residuos humanos. Las colonias más naturales se ubican en el Parque Nacional de Cabañeros (30S 8305.90m E 4358788.87m N) y en una finca agrícola próxima a la localidad de Abenójar (30S 382225.84m E 43604263.74 m N). Otras dos colonias del estudio se ubicaron en vertederos; uno de ellos en la localidad de Alcázar de San Juan (30S 481904.15m E 4360069.49m N) y otro en la localidad de Almodóvar del Campo (30S 397521.06m E 4285135.60m N), éste último se encuentra sellado desde 2007. Por otra parte, se estudiaron diversos individuos de esta misma especie admitidos durante 2013 en el Centro de Recuperación de aves “El Chaparrillo” (Ciudad y Real) y en el Centro de Estudios de Rapaces Ibéricas en Sevilleja de la Jara (Toledo).

2. Ejemplares muestreados

Se seleccionaron ejemplares de adultos de cigüeña blanca en cada una de las 4 poblaciones ubicadas en nuestra área de estudio. Estos ejemplares fueron capturados en el nido para su marcaje con transmisores satélite y muestreados a principios del mes de mayo de 2013, al inicio de la época de cría. Se muestrearon un total de 9 individuos; 2 ejemplares en el Parque Nacional de

Cabañeros, 2 en Abenójar, 2 en el vertedero de Almodóvar del campo y 3 en el vertedero de Alcázar de San Juan (Tabla 2).

En el mes de junio se muestrearon los pollos. El muestreo tuvo lugar cuando éstos tenían una edad de entre 40 y 50 días. Al mismo tiempo se procedió al anillamiento de los individuos. Se muestrearon un total de 81 pollos de cigüeña blanca: 15 en el Parque Nacional de Cabañeros, 28 en Abenójar, 30 en Almodóvar del Campo y 8 en la colonia más pequeña de todas las estudiadas, en el vertedero de Alcázar de San Juan (Tabla 2).

Los individuos admitidos en los centros de recuperación eran todos pollos. Fueron recogidos y muestreados en los meses de julio, agosto y septiembre de 2013, época en la que los pollos de cigüeña abandonan el nido para alimentarse por sí solos al ser ya capaces de volar. Se muestrearon un total de 30 pollos, 15 en cada uno de los dos centros de recuperación seleccionados para el estudio.

3. Toma de muestras.

Los individuos adultos se capturaron a principios del mes de mayo de 2013. Los animales capturados se marcaron con transmisores satélite solar (solar PTT, Microwave telemetry inc., USA), con objeto de poder estudiar con exactitud los movimientos locales y migratorios de esta especie. Tanto a los adultos como a los pollos se les colocaron sendas anillas metálicas y de PVC, para identificación en caso de recogida y para lectura a distancia.

A todos los individuos en las colonias se les extrajo un volumen de sangre de 5ml. de la vena braquial que se transfirió inmediatamente a tubos estériles con heparina litio como anticoagulante. Se muestreó la cloaca de cada uno de los individuos mediante hisopo de algodón estéril conservado en medio AMIES (Deltalab, Barcelona, España). Se obtuvieron hisopos cloacal y orofaríngeo en medio específico de transporte para virus (solución Hank balanceada que contiene 10% Glicerol, 200 U/ml Penicilina, 200 mg/ml Estreptomicina, 100 U/ml Polimixina B, 250mg/ml Gentamicina y 50 U/ml Nistatina, Munster et al., 2007). Se obtuvieron varias plumas cobertoras, así como el peso y medidas biométricas.

Los individuos de los centros de recuperación fueron muestreados el mismo día de su llegada al centro. Un pollo se muestreó días posteriores a su llegada debido a su corta edad. Se extrajo sangre de la vena braquial y se obtuvieron hisopos cloacales y orofaríngeos en medio de transporte para virus y AMIES.

Todas las muestras fueron recogidas con material estéril, mantenidas a 4° C hasta su llegada al laboratorio del IREC, y procesadas en un plazo inferior a 12 horas después de su toma.

4. Análisis de las muestras.

Los diferentes análisis consistieron en :

- a. Hematología: Se determinó el valor de hematocrito en sangre. A continuación, las muestras se centrifugaron y del plasma así obtenido se realizó la medición de proteínas totales mediante refractómetro. Se conservaron a -80° C diferentes alícuotas de plasma para posteriores estudios.
- b. Serología: En una alícuota de plasma se estudió la presencia de anticuerpos de IA, ND y WNV mediante ELISA de competición.
 - Para la detección de anticuerpos frente a WNV se utilizó un ELISA comercial de competición que emplea como antígeno virus entero inactivado (ID Screen®®, West Nile Competition, IDVet, Montpellier, France).
 - Igualmente para la detección de anticuerpos frente al virus ND se utilizó un ELISA comercial de competición específico (ID Screen®®, Newcastle competition, IDVet; Montpellier, France).
 - Para la detección de anticuerpos frente al virus de IA se utilizó un ELISA comercial de competición para este virus (Ingezim Influenza A 1.0. FLU.K.3, Madrid, España)
- c. Microbiología: Se realizó el aislamiento e identificación de las enterobacterias *E. coli* y *Salmonella spp.* según metodología ISO.

- Para el aislamiento de *E. coli* cada uno de los hisopos cloacales se sembraron en placas de agar McConkey (Scharlab S.L, Barcelona, España) y se incubaron a 37° C durante 24 horas. Las colonias consideradas *E. coli* por su morfología y color, fueron sometidas a cultivo en medio McConkey con antibiótico con el fin de determinar fenotipos de antibiorresistencia.

- *Salmonella spp*: El aislamiento de *Salmonella spp.* fue realizado conforme al método estandarizado ISO 6579 (2002). Primero se realizó un pre-enriquecimiento de las muestras. Para ello, se introdujo el hisopo cloacal en caldo de peptona y se incubó a 37° C durante 24 horas. Después, 1ml de este caldo se homogeneizó y se transfirió a caldo Rappaport Vassiliadis Soja (Scharlab, España) que se incubó a 42° C durante 24 horas. Finalmente se sembró en placa con agar XLD (Scharlab, España) y se incubó a 37° C durante 24 horas. Las colonias consideradas *Salmonella spp.* por su morfología y color, fueron recogidas en agua ultrapura para la extracción del ADN mediante la técnica de ebullición. El ADN así extraído fue llevado a refrigeración hasta posterior confirmación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por amplificación del gen *invA*.

La amplificación del gen *InvA* para la confirmación de las colonias como *Salmonella* fue llevada a cabo mediante PCR, según el protocolo descrito por Rahn et al. (1992), en una mezcla de reacción con un volumen total de 30 µl conteniendo: 2 µl de ADN; 0,2 µl Enzima (5U/µl); 3 µl de cebador *invA*-L (0,01 mM); 3 µl de cebador *invA*-R (0,01 mM); 3 µl Buffer (10x); 0.6 µl dNTP's (10 mM); 0.9 µl MgCl₂ (50 mM); 17.3 µl ddH₂O. La reacción se realizó en termociclador Techne modelo TC-512 (Techne Inc. Cambridge, U.K) siguiendo el siguiente protocolo: 94° C/3min.; 40 ciclos de 95° C/30seg., 55° C/30seg., 72° C/30seg.; y un ciclo final de 72° C/10min. Las muestras fueron sometidas a una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2%. Las amplificaciones fueron teñidas con gel red y leídas en un transiluminador de UV UVIttec-Cambridge (Uvitec Ltd. Cambridge, U.K) con captador de imágenes.

- d. Patrones fenotípicos de antibiorresistencias: Se evaluó la susceptibilidad de las cepas aisladas de *E. coli* y *Salmonella spp.* a determinados antimicrobiales.

El patrón fenotípico de resistencia a los antimicrobiales de las cepas de *E. coli* se evaluó mediante la siembra en medios de McConkey suplementados con tres antimicrobiales diferentes. Se prepararon placas con una concentración en gentamicina de 16µg/ml (Sigma-Aldrich química, Madrid, España), de cefotaxima 4µg/ml (Sigma) y Mc Conkey con enrofloxacin 4µg/ml (Sigma). Estas placas fueron incubadas a 37° C durante 24 horas. Colonias morfológicamente compatibles con *E. coli*, que crecieron con las concentraciones de antimicrobiales, fueron registradas como indicio de resistencia al antibiotico en cuestión, y congeladas en agar cerebro -corazón a -80° C para futuros análisis.

El patrón de antibiorresistencia de las cepas de *Salmonella spp.* se evaluó mediante la siembra de las colonias confirmadas por PCR como *Salmonella spp.* en placa XLD suplementadas con los mismos antibióticos y concentraciones que los utilizados en la evaluación de antibiorresistencias de *E. coli*, e incubadas a 37° C durante 24 horas.

La elección de los diferentes antibióticos se basó en el uso frecuente que en España se hace de ellos. Gentamicina y enrofloxacin son utilizados en ganadería y en animales de compañía. Cefotaxima o similares cefalosporinas se administran a humanos. Las concentraciones utilizadas son las recomendadas por el National Antimicrobial Resistance Monitoring System (NARMS, Food and drug administration, Centers for Disease control and prevention, United States Department of Agriculture, 2010).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En primer lugar se determinó un índice de condición corporal para cada uno de los individuos estudiados mediante una regresión del peso sobre la longitud del tarso. Previamente se había confirmado la relación lineal entre ambas variables ($r = 0,83$).

Mediante un análisis de la Chi-cuadrado ($p \leq 0.05$), se estudió la diferencia de la prevalencia de patógenos y anticuerpos, entre las cigüeñas adultas y los pollos, entre las colonias sitas en medio natural y en vertedero, y entre los animales silvestres y los procedentes de centro de recuperación.

Además de la prevalencia de *E. coli* en la cloaca de los individuos, se comparó entre los grupos mencionados la prevalencia de los fenotipos de resistencia frente a gentamicina, enrofloxacin y cefotaxima, así como la prevalencia de fenotipos de resistencias a 2 y 3 antibióticos a la vez. También se estudió la prevalencia de *Salmonella spp.* y de anticuerpos frente a WNV.

Posteriormente, se realizó la comparación entre las 4 poblaciones de campo estudiadas mediante un Modelo Lineal Generalizado (GLM), incluyendo la edad como covariable.

En el análisis de los datos se utilizó el programa estadístico SPSS, versión 19.0 (IBM®, SPSS Inc., Chicago, USA).

RESULTADOS

• Adultos y pollos

Cuando se analizan los datos de las colonias muestreadas, diferenciando entre pollos y adultos, la prevalencia de *E. coli*, es significativamente mayor en los pollos (90,1%, 73 de 81) que en los individuos adultos (44,4%, 4 de 9) (χ^2 , 1 g.l. y $p < 0.05$, tabla 2). Anticuerpos frente a WNV se encontraron en el 44,4 % de los adultos (4 de 9, χ^2 , 1 g.l. $p < 0,05$), mientras que no se detectaron en ninguno de los pollos (Tabla 2).

•Tipos de colonias:

Los individuos procedentes de las colonias de vertedero presentan una condición corporal significativamente mejor que los individuos establecidos en colonias naturales (Anova de un factor, F 36,808, 1 g.l. $p \leq 0,05$) (Figura 2).

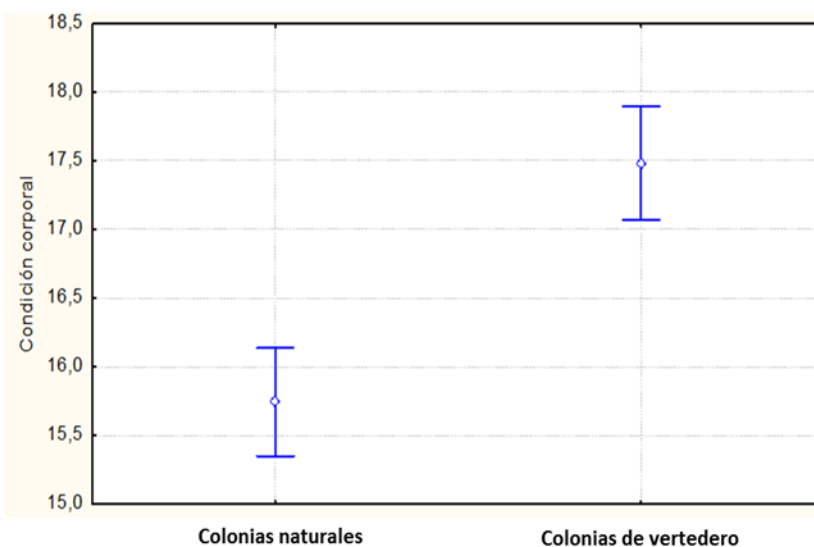


Figura 2. Índice de condición corporal de los individuos de cigüeña blanca establecidos en colonias naturales y en vertedero.

Para los valores hematocrito y proteínas totales (sólidos totales) no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos, aunque existe una tendencia a valores más elevados en los individuos de colonias naturales (Tabla 1).

	N	Biometría			Hematología	
		Tarso (mm) (±σ)	Peso (g) (±σ)	ICC (±σ)	Ht (%) (±σ)	Pt (mg/ml) (±σ)
Natural	47	188,63 (22,9)	2974,5 (467,3)	15,74 (1,2)	38,7 (5,6)	4,9 (0,4)
Vertedero	43	189,7 (23,9)	3326,8 (558,6)	17,5 (1,5)	37,1 (8,5)	4,9 (0,4)

Tabla 1 Media de los datos biométricos (tarso, peso e índice condición corporal) y análisis hematológico (hematocrito y proteína total) de los individuos de cigüeña blanca analizados según su tipo de hábitat

Los *E.coli* aislados de cigüeñas procedentes de colonias asociadas a vertedero presentaron significativamente más resistencias frente a gentamicina (60,5%, 23 de 38, χ^2 , 1 g.l. y $p < 0.05$), cefotaxima (34,2%, 13 de 38, χ^2 , 1 g.l. y $p < 0.05$) y a dos antibióticos a la vez (44,7%, 17 de 38, χ^2 , 1 g.l. y $p < 0.05$) que los procedentes de zonas naturales (Tabla 2).

Salmonella spp. no se aisló en cigüeñas procedentes de colonias naturales y se detectó en un adulto (1 de 5, 20%) y en tres pollos (3 de 38, 7,9%) procedentes de vertedero.

Mediante ELISA se hallaron anticuerpos frente a WNV en 2 de los 4 adultos (50%) de las colonias naturales y en 2 de 5 cigüeñas adultas (40%) de las colonias de vertedero. No se detectaron anticuerpos frente a WN en ninguno de los pollos silvestres (Tabla 2).

Si comparamos las cuatro colonias muestreadas, destaca la condición corporal de los pollos procedentes de la colonia de Almodóvar del Campo que es significativamente mayor que en ambas colonias naturales (GLMM, 3 g.l. $p < 0,05$) (Figura 3).

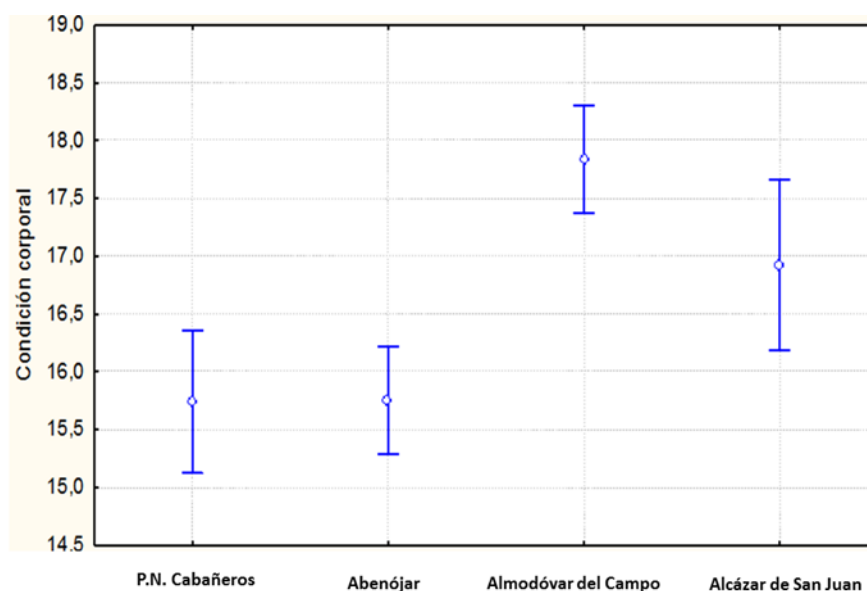


Figura 3 Media e intervalos de confianza del índice de condición corporal de los individuos de cigüeña blanca por poblaciones (1: P.N de Cabañeros; 2: Abenójar; 3 Almodóvar del Campo; 4: Alcázar de San Juan)

- Animales silvestres y admitidos a centro de recuperación.

Las prevalencias de los patógenos y anticuerpos estudiados no difieren significativamente entre las cigüeñas muestreadas en el campo y las admitidas a CRFS.

- Colonia natural - Vertedero - CRFS

Sin embargo, si diferenciamos en las cigüeñas de campo entre las procedentes de colonias naturales y las procedentes de vertedero, y las comparamos con las recibidas en los centros de recuperación, detectamos que las prevalencias de *E. coli* resistentes a cefotaxima en los individuos de centro de recuperación (11 de 30, 36,7%) y en los de colonias de vertedero (13 de 38, 34,21%) son significativamente mayores que en cigüeñas procedentes de colonias naturales (4 de 43, 9,3%) (χ^2 , 2 g.l. y $p < 0.05$). Fenotipos de resistencia a dos antibióticos diferentes, también se encontraron significativamente más frecuentemente en individuos de vertedero (44,7%, 17 de 38), y de centro de recuperación (40%, 12 de 30) que en individuos procedentes de colonias naturales (13,9%, 6 de 43) (χ^2 , 2 g.l. y $p < 0,05$) (Figura 4).

La prevalencia de *Salmonella spp.* fue similar en los individuos muestreados en centro de recuperación (4 de 30, 13,3%) y en vertedero (4 de 43, 9,30%). No se encontró ningún individuo portador de *Salmonella spp.* en colonias naturales (Figura 4)

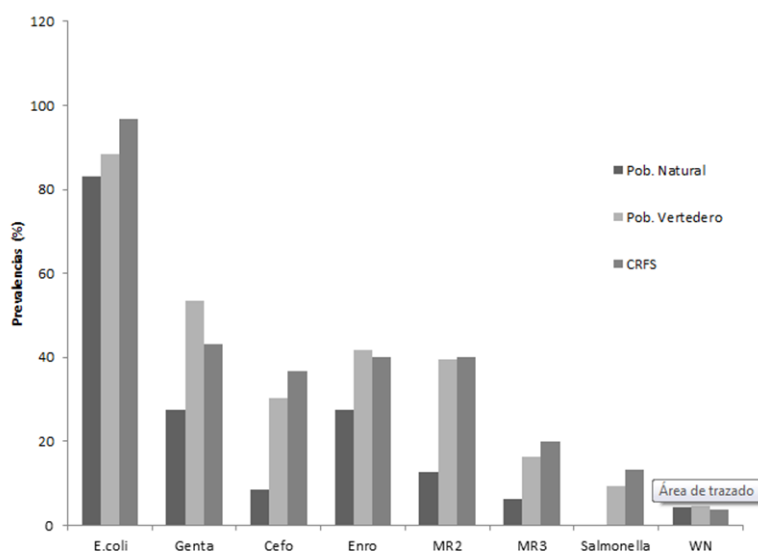


Figura 4 Prevalencia de *E. coli* y *Salmonella*, patrones de antibiorresistencias y seroprevalencia de anticuerpos frente a WNV en individuos de cigüeña blanca analizados en colonias naturales, colonias de vertedero y centros de recuperación.

		PREVALENCIA n/N (%)		PATRONES DE RESISTENCIA n/N (%)					SEROPREVALENCIA n/N (%)			
Población	Edad	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	Genta.	Cefto.	Enro.	MR3	MR2	WNV	ND	IA	
NATURAL	CBÑ	Pollo	13/15 86,8%	0/15 0%	7/15 46,7%	2/15 13,3%	2/15 13,3%	1/15 6,7%	3/15 20%	0/15 0%	0/15 0%	0/15 0%
		Adulto	0/2 0%	0/2 0%	0/2 0%	0/2 0%	0/2 0%	0/2 0%	0/2 0%	0/2 0%	0/2 0%	0/2 0%
	ABJ	Pollo	25/28 89,3%	0/28 0%	5/28 17,8%	2/28 7,1%	11/28 39,3%	2/28 7,1%	3/28 10,7%	0/28 0%	0/28 0%	0/28 0%
		Adulto	1/2 50%	0/2 0%	1/2 50%	0/2 50%	0/2 0%	0/2 0%	0/2 0%	2/2 100%	0/2 0%	0/2 0%
VERTEDERO	ASJ	Pollo	8/8 100%	1/8 12,5%	6/8 75%	5/8 62,5%	3/8 37,5%	2/8 25%	4/8 50%	0/8 0%	0/8 0%	0/8 0%
		Adulto	2/3 66,7%	1/3 33,3%	0/3 0%	0/3 0%	0/3 0%	0/3 0%	0/3 0%	0/3 0%	0/3 0%	0/3 0%
	ALM	Pollo	27/30 90%	2/30 6,7%	17/30 56,7%	8/30 26,7%	15/30 50%	5/30 16,7%	13/30 43,3%	0/30 0%	1/30 3,3%	0/30 0%
		Adulto	1/2 50%	0/2 0%	0/2 0%	0/2 0%	0/2 0%	0/2 0%	0/2 0%	2/2 100%	1/2 50%	0/2 0%
CR	CR	Pollo	29/30 96,7%	4/30 13,3%	13/30 43,3%	11/30 36,7%	12/30 40%	6/30 20%	12/30 40%	1/27 3,7%	0/27 0%	1/27 3,7%

N: N° individuos totales; n: n° individuos positivos

Tabla 2 Prevalencia de *E. coli*, y *Salmonella spp.*, patrones de antibiorresistencias a gentamicina (Genta), cefotaxima (Cefto) y enrofloxacin (Enro), multiresistencia a 2 (MR2) y 3 (mr3) antibióticos, y seroprevalencia frente a virus West Nile (WNV), Newcastle (ND) e Influenza aviar (IA), de los individuos de cigüeña blanca analizados según su edad, hábitat y poblaciones (Parque Nacional de Cabañeros (CBÑ), Abenójar (ABJ), Alcázar de San Juan (ASJ), Almodóvar del Campo (ALM) y centro de Recuperación de Fauna Salvaje (CR))

DISCUSIÓN

Este es uno de los pocos estudios en los que se analiza la prevalencia de ciertos patógenos víricos y bacterianos, así como la resistencia de éstos últimos frente a determinados antibióticos, entre individuos procedentes de centro de recuperación e individuos silvestres, utilizando como especie modelo la cigüeña blanca.

Los resultados de este estudio muestran que los individuos establecidos en colonias de vertedero presentan un mayor índice corporal que los establecidos en colonias naturales, debido a la disponibilidad de alimento. Estos resultados son similares a los hallados en un estudio anterior (Ramiro, 2011). En nuestro estudio, como en el anteriormente citado, no se encontraron diferencias significativas para los valores de hematocrito.

Respecto a los patógenos, la prevalencia de *E.coli* entre las diferentes colonias estudiadas no es significativamente diferente, tampoco entre éstas ni entre los individuos procedentes de centros de recuperación. Esto puede deberse a que ésta enterobacteria se encuentra ampliamente distribuida en todos los tipos de ambientes. Han et al. (2011) aislaron *E.coli* en la mayoría de las cigüeñas analizadas y concluyeron que forman parte de la flora permanente de éstas.

Las colonias naturales escogidas para nuestro estudio se encuentran situadas en zonas en las que existe actividad ganadera, lo que hace muy probable el contacto de las cigüeñas con heces, estiércoles y otros residuos. El que los valores de prevalencia de *E.coli* sean mayores en pollos que en adultos podría estar asociado a un cambio en la flora intestinal (disbiosis) en relación con el estrés en la época de cría en los adultos. Estos resultados también se podrían haber producido por el sobrecrecimiento de otras especies bacterianas en los hisopos durante el periodo de refrigeración previo a la siembra, que era algo mayor en las muestras de los adultos.

La mayor prevalencia de patrones de antibiorresistencias a gentamicina, cefotaxima y multirresistencia a dos tipos diferentes de antibióticos en las colonias de vertedero está muy probablemente relacionada con el contacto

más directo con los residuos antropogénicos. Este hallazgo y esta interpretación han sido constatados previamente en cigüeñas (Ramiro-Rubio, 2011) y en otras especies como gaviotas (Camarda et al., 2007). Los datos indican que según la procedencia de un individuo de la misma especie, en este caso de cigüeña blanca, su grado de exposición a determinados patógenos puede ser muy diferente.

Al igual que para *E.coli*, las prevalencias de *Samonella spp.* obtenidas en los individuos de los centros de recuperación son similares a las de los individuos de vertedero. Los vertederos son puntos de agregación de multitud de especies silvestres, pudiendo incrementarse el riesgo de infección de ciertos patógenos bacterianos por transmisión feco-oral (Ramiro, 2011). La colonia del vertedero de Alcázar de San Juan es la que está situada en un medio más inhóspito, presentando actividad industrial en el momento del estudio, provocando que las cigüeñas entren en contacto con los residuos antes del tratamiento de éstos y haciendo posible la adquisición de este tipo de patógeno. Sin embargo, el marcaje con transmisores reveló que los adultos de la colonia del vertedero sellado de Almodóvar obtienen el alimento para sus pollos del vertedero de Almagro, es decir en una situación similar a la de Alcázar. La ausencia de *Salmonella spp.* en cigüeñas de población natural, se ha constatado previamente en otros estudios como el realizado por Vláhovic et al. (2004) en Croacia.

En el presente estudio las prevalencias de enterobacterias (*E. coli* y *Salmonella*) y de fenotipos de antibiorresistencias observadas en cigüeñas admitidas en centros de recuperación eran parecidas a las observadas en los pollos muestreados en vertedero y mayores a las observadas en pollos procedentes de colonias consideradas naturales.

Es decir, nuestros resultados sugieren que, bien los pollos de cigüeña admitidos a los centros de recuperación proceden de colonias situadas cerca de vertederos o en los que los pollos son alimentados con comida procedente de vertederos, bien que los pollos de cigüeña tras salir del nido se alimentan en los vertederos, o bien, que independientemente de su procedencia, los

individuos heridos hayan adquirido los patógenos después de sufrir la causa de admisión. En el primer caso significaría que las cigüeñas procedentes de colonias asociadas a vertederos son más susceptibles a sufrir accidentes, en el segundo que en el caso de pollos de cigüeña en emancipación la exposición a residuos es igual para todos los individuos, y en el último, que una cigüeña herida es más susceptible a la infección por potenciales patógenos. Dado la alta movilidad de las cigüeñas y el hecho de que ninguno de los pacientes de los CRFS portaba anilla o transmisor no nos permite determinar su procedencia. Sin embargo los datos reflejan también que las prevalencias encontradas en esta especie en los CRFS refleja correctamente las prevalencias en el conjunto de la población.

Para la seroprevalencia de WNV, no se encontraron diferencias significativas entre los individuos que pertenecían a distintas colonias o a centros de recuperación. El hecho de que en las colonias sólo aparezcan anticuerpos en adultos y ningún pollo, confirma el que los adultos han estado en contacto con el virus a lo largo de su vida, quizás a través de sus rutas migratorias, como aparece descrito en otros estudios (Figuerola et al 2007). Los anticuerpos frente a WNV encontrados en un pollo de los muestreados en centro de recuperación, hace pensar que estos anticuerpos sean maternos. Randall et al. (2012), realizaron un estudio en el que llegaban a la conclusión de que los individuos admitidos en los centros de recuperación no eran representativos de las poblaciones naturales de estos individuos. Para ello utilizó la prevalencia del virus de WN en 13 órdenes diferentes de aves. Quizás, la baja prevalencia de este virus en la zona de muestreo, el trabajar con un área demasiado pequeña o con un número tan elevado de órdenes, hizo llegar a esas conclusiones como él mismo admite. López et al. (2011) realizaron un trabajo entre los años 2004 y 2006 en el sur de España con tejidos y sueros de aves silvestres que llegaban a los centros de recuperación, encontrando prevalencias de anticuerpos frente a WN del 2,2% y similares a las de aves sanas de la misma especie que fueron capturados en el campo. Al encontrar las mayores seroprevalencias en individuos adultos silvestres, y no analizar ninguno en centro de recuperación, no podemos afirmar que para WNV los centros de recuperación sean representativos de la prevalencia en cigüeñas.

Anticuerpos frente a VIA sólo se detectaron en un pollo procedente de centro de recuperación. El contacto con el virus pudo haberse producido en el mismo centro, ya que este pollo ingresó en el centro con pocos días de vida y fue muestreado posteriormente. La época en la que realizamos nuestro estudio pudo haber influido en nuestros hallazgos. Estudios anteriores ponen de manifiesto que la época en la que se encuentran picos de prevalencia para IA tiene lugar en los meses de octubre y noviembre (Pérez-Ramírez et al. 2010), cuando miles de aves migratorias llegan a España para invernar. En Alemania, entre 2003 y 2008, Müller et al. (2009) analizaron más de 600 pollos y 88 adultos de cigüeña blanca en búsqueda de genoma y anticuerpos frente a VIA, no encontrándose ningún caso positivo. Sin embargo, fueron hallados dos individuos muertos de esta especie en ese mismo lugar de muestreo que resultaron positivos a H5N1. A pesar de estos dos casos, la cigüeña blanca no parece servir como vector ni como reservorio para VIAAP en Alemania y concluyeron que esta especie tenía bajo riesgo como transmisor del virus a las aves de corral y a los seres humanos. Para Guberti et al. (2007), la propagación de IA altamente patógena (IAAP) H5N1 hace necesario comprender mejor los mecanismos por los cuales se propaga la enfermedad. La vigilancia actual de la vida silvestre se ha limitado a una combinación de muestreos específicos, oportunista y al estudio sobre animales muertos. El interés por la gripe aviar ofrece una oportunidad para desarrollar un programa de vigilancia de las enfermedades en las aves silvestres. Aunque la detección de H5N1 en aves silvestres sanas es esporádica, los programas de vigilancia deben centrarse en el papel que la vida silvestre juega en la epidemiología del virus y en las estrategias de orientación para prevenir la exposición a la enfermedad a los seres humanos y aves de corral. Los centros de recuperación pueden servir como lugar de muestreo de este virus.

De todos los individuos analizados se detectaron dos casos positivos a Newcastle, un pollo y un adulto, en la colonia vertedero de Almodóvar del Campo. No se detectó ningún caso positivo en cigüeñas admitidas en centros de recuperación. La seroprevalencia de Newcastle en cigüeña blanca ha sido poco estudiada y siempre realizada en individuos de centro de recuperación.

Stenzel et al. (2008), encontró seroprevalencias del 20% en cigüeñas blancas de centros de recuperación en Polonia

En un futuro, sería de interés el trabajar en el anillado de individuos; a mayor número de individuos identificados mayores serían las probabilidades de reconocimiento de éstos en el caso de que fuesen recepcionados en centros de recuperación. Si bien, esta forma de trabajo debiera realizarse en especies con menor número de individuos debido al alto coste económico que supone.

El mirar otros índices en los animales de vertedero (estrés oxidativos, niveles de exposición a contaminantes, etc.) podría indicarnos porqué estos animales se parecen más a los admitidos en los centros de recuperación, es decir, si realmente son más susceptibles a sufrir accidentes.

CONCLUSIONES

- Las poblaciones de cigüeña blanca asociadas a vertedero presentaban mejor índice de condición corporal que los individuos de zonas de no vertedero, posiblemente debido a la disponibilidad abundante y continua de alimentos.
- La prevalencia de patógenos, fenotipos de antibioresistencia, y de anticuerpos del conjunto de cigüeñas muestreado en los CRFS era representativo de la prevalencia del conjunto de las cigüeñas silvestre muestreadas en la región.
- Sin embargo, cuando se diferencian poblaciones por hábitat, el estado sanitario de los pollos de cigüeña admitidos a centros de recuperación es más parecido al de aquellos que viven en zonas menos naturales.
- Las enterobacterias de los individuos que llegan a los centros de recuperación presentan similares patrones de antibiorresistencias a las enterobacterias de las cigüeñas que viven en vertederos.

- Cigüeñas blancas que llegan a los centros de recuperación pueden ser utilizadas como indicadores de la emergencia de bacterias portadoras de mecanismos de antibiorresistencias en las poblaciones silvestres.
- Los pollos de cigüeña blanca admitidos a centros de recuperación no son buenos indicadores de las seroprevalencias frente a WNV, ND e IA en las colonias silvestres.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en el marco del proyecto: ¿Centinela o vector?. El papel de la cigüeña blanca en la epidemiología de los virus de Influenza Aviar (RTA2011-00111-C03-02), financiado por el INIA.

Agradecemos al personal de Seo-Birdlife su ayuda en la captura de los individuos adultos y el marcaje de éstos, y a D. José Manuel Hernández por el anillado de todos los individuos e identificación de nidos. Gracias al personal del CRFS el Chaparillo y del CERI por facilitarnos las muestras de las cigüeñas admitidas como pacientes, especialmente a Elena Crespo y Amalia García.

Finalmente, agradezco a Úrsula Höfle, mi directora, la oportunidad de permitirme participar en este proyecto y su ayuda en todo momento.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, J.I. & Atienza, J.C., 2002. Censo de la población reproductora de Cigüeña Blanca (*Ciconia ciconia*) en la Comunidad de Madrid. Año 2001. Anuario Ornitológico de Madrid, 2001, 114-125.
- Alexander, D.J., Banks, J., Collins, M.S., Manvell, R.J., Frost, K.M., Speidel, E.C. & Ldous, E.W., 1999. Antigenic and genetic characterization of Newcastle disease viruses isolated from outbreaks in domestic fowl and turkeys in Great Britain during 1997. *Veterinary Record*, 145, 417–421.
- Austin, R.J., Whiting, T.L., Anderson, R.A., 2004. An outbreak of West Nile virus associated disease in domestic geese (*Anser anser domesticus*) upon

initial introduction to a geographic region, with evidence of bird to bird transmission. *Can. Vet. J.* 45, 117-123.

- Blanco, G., 1996. Population dynamics and communal roosting of White Storks foraging at a Spanish refuse dump. *Colonial Waterbirds*, 19, 273-276.
- Blanco, J.E., Blanco, M., Mora, A. & Blanco, J., 1997. Prevalence of bacterial resistance to quinolones and other antimicrobials among avian *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 2184-2185.
- Camarda, A., Circella, E., Giovanardi, D., Pennelli, D., Battista, P., Campagnari, E., Bruni, G. & Tagliabue, G., 2007. Avian Pathogenic *Escherichia coli* in Audouin gulls (*Larus audouinii*). Could they affect the surviving of the bird colonies?. *Italian Journal of Animal Science*, 6, 317-320.
- Coburn, B., Grassl, G.A., Finlay, B.B., 2006. Salmonella, the host and disease: a brief review. *Immunol Cell Biol*, 85, 112-118.
- Diaz, S., 2012. *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* y *Campylobacter spp.* en fauna silvestre cinegética de Castilla-La Mancha: implicaciones sanitarias y de Salud Pública. Tesis doctoral, UCLM, 222 pp.
- Dziva, F., Stevens, M.P., 2008. Collibacillosis in poultry: unraveling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. *Avian Pathol*, 37, 355-366.
- Eidson, M., 2001. Neon needles in a haystack: The advantages of passive surveillance for West Nile virus. *Annals New York Academy of Sciences* 951, 38–53.
- Figuerola, J., Jiménez-Clavero, M.A., Rojo, G., Gómez-Tejedor C.& Soriguer, R., 2007. Prevalence of West Nile virus neutralizing antibodies in colonial aquatic birds in southern Spain. *Avian Pathol*, 36, 209–212.
- Garmendia, A., Herbert, J., Krüning, V., French, R., Anderson, J., Andreadis, T., Kumar, A., West, B., 2000. Recovery and identification of West Nile virus from a hawk in winter. *J. Clin. Microbiol*, 38, 3110-3111.

- Gordon, D.M., Cowling, A., 2003. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiol* 149, 3575-3586.
- Guberti, V., & Newman, S. H., 2007. Guidelines on wild bird surveillance for highly pathogenic avian influenza H5N1 virus. *Journal of Wildlife Diseases*, 43 (3 SUPPL.), S29-S34.
- Gutierrez , A.V., 2012. Aportaciones al conocimiento epidemiológico del virus West Nile y otros flavivirus relacionados en España. Tesis doctoral, UCLM, 205 pp.
- Gyles, C.L., 2004. *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International (Eds), Wallingford, USA.
- Han, J., Jang, H., Lee, S., Kang, H., Kim, S., Park, S., & Na, K., 2011. Bacterial flora of the intestine in normal captive oriental white storks. *Journal of Veterinary Clinics*, 28(5), 516-518.
- Kaleta, E.F., & Kummerfeld, N., 2012. Isolation of herpesvirus and Newcastle disease virus from white storks (*Ciconia ciconia*) maintained at four rehabilitation centres in northern Germany during 1983 to 2001 and failure to detect antibodies against avian influenza A viruses of subtypes H5 and H7 in these birds. *Avian Pathology*, 41(4), 383-389.
- Kaleta, E.F., Hergarten, G., Yilmaz, A., 2005. Avian Influenza A viruses in birds- an ecological, ornithological and virological view. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.* 112:441-448
- Kauffman, F., 1972, Serological diagnosis of *Salmonella* species. Munksgaard (Eds.), Copenhagen, Denmark
- Kelly, T.R., & J.M. Sleeman., 2003. Morbidity and mortality of red foxes (*Vulpes vulpes*) and gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) admitted to the wildlife center of Virginia, 1993–2001. *Journal of Wildlife Diseases*, 39, 467–469.

- Khun, K.G., Torpdahl, M., Frank, C., Siggaard, K., Ethelberg, S., 2011. An outbreak of *Salmonella typhimurium* traced back to salami, Denmark, April to June 2010. *Euro Surveill* 16.
- Kuiken, T., 1998. Newcastle disease and other causes of mortality in double-crested cormorants (*Phalacrocorax auritus*). Ph.D. Dissertation. University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Canada.
- López, G., Jiménez-Clavero, M.A., Vázquez, A., Soriguer, R., Gómez-Tejedor, C., Tenorio, A., & Figuerola, J., 2011. Incidence of West Nile virus in birds arriving in wildlife rehabilitation centers in southern Spain. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(3), 285-290.
- Lopez, G., Jimenez-Clavero, A., Tejedor, C.G., Soriguer, R., Figuerola, J., 2008. Prevalence of West Nile Virus neutralizing antibodies in Spain is related to the behaviour of migratory birds. *Vector Borne Zoonotic Diseases*, 8, 615-621.
- Marra, P.P., Griffing, S., Cafrey, C., Kilpatrick, A.M., Mclean, R., Brand, C., Saito, E., Dupuis, A.P., Kramer, L., Novak, R., 2004. West Nile virus and wildlife. *Bioscience*, 54, 393-402.
- Mclean, R.G., UBICO, S.R., 2007. Arboviruses in birds. *Infectious Diseases of wild birds*. Blackwell Publishing. 17-28.
- Mellata, M., 2013. Human and avian extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: Infections, zoonotic risks, and antibiotic resistance trends. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(11), 916-932.
- Molina, B. & Del Moral, J.C., 2005. La Cigüeña Blanca en España. VI Censo Internacional (2004). SEO/BirdLife. Madrid.
- Molina-López, R.A., Casal, J., Darwich, L., 2011. Causes of morbidity in wild raptor populations admitted at a wildlife rehabilitation centre in Spain from 1995–2007: A long term retrospective study. *PLoS ONE* 6: e24603.
- Müller, T., Hlinak, A., Freuling, C., Muhle, R., Engelhardt, A., Globig, A., Schulze, C., Starick, E., Eggers, U., Sass, B., Wallschläger, D., Teifke, J.,

Harder, T., Conraths, F.J., 2009. Virological Monitoring of White Storks (*Ciconia ciconia*) for Avian Influenza. *Avian Diseases*, 53(4), 578-584

- Munster, J.V., Baas, C., Lexmond, P., Waldenstrom, J., Wallensten, A., Fransson, T., Rimmelzwaan, G.F., Beyer, W.E.P., Schutten, M., Olsen, B., Osterhaus, A.D.M.E. & Fouchier, R.A.M., 2007. Spatial, temporal, and species variation in prevalence of influenza A viruses in wild migratory birds. *PLoS pathogens* 3 (5), e61.

- Nemeth, N.M., Oesterle, P.T. & Bowen, R.A., 2008. Passive Immunity to West Nile Virus Provides Limited Protection in a Common Passerine Species. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 79(2), 283–290.

- OIE., 2009. Informe 8695. Notificación inmediata enfermedad de Newcastle, España(26/11/2009).

www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Review?page_refer=MapEventSummary&reportid=8695 (acceso 21-11-2013)

- Palomo, G., Campos, M.J., Ugarte, M., Porrero, M.C., Alonso, J.M., Borge, C., Píriz, S., 2013. Dissemination of antimicrobial-resistant clones of salmonella enterica among domestic animals, wild animals, and humans. *Foodborne Pathogens and Disease*, 10(2), 171-176.

- Pérez, E., 2010. Influenza aviar en aves silvestres de Castilla-La Mancha: diagnóstico, patogenia y epidemiología. Tesis doctoral ,UCLM, 180 pp.

- Pérez-Ramírez, E., Gerrikagoitia, X., Barral, M., & Höfle, U., 2010. Detection of low pathogenic avian influenza viruses in wild birds in Castilla-La Mancha (south central Spain). *Veterinary Microbiology*, 146(3-4), 200-208.

- Radhouani, H., Poeta, P., Goncalves, A., Pacheco, R., Sargo, R., Igrejas, G., 2012. Wild birds as biological indicators of environmental pollution: antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* and enterococci isolated from common buzzards (*Buteo buteo*). *Journal of Medical Microbiology*, 61(6), 837-843.

- Rahn, S.A., De Grandis, R.C., McEwen, S.A., Galan, J.E., Ginocchio, C., Curtiss, R., & Gyles, C.L., 1992. Amplification of an inv A gene sequence of

Salmonella typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of Salmonella. *Molecular and Cellular Probes* 6, 271-279.

- Ramiro, Y., 2011. Cigüeñas blancas (*Ciconia ciconia*) y vertederos: efectos del uso de vertederos en la condición física, inmunidad y prevalencia de patógenos. Trabajo fin de máster, UCLM, 34 pp.
- Randall, N.J., Blitvich, B.J., Blanchong, J.A., 2012. Efficacy of wildlife rehabilitation centers in surveillance and monitoring of pathogen activity: A case study with west Nile virus. *Journal of Wildlife Diseases*, 48(3), 646-653.
- Rodriguez-Siék., K.E., Giddings, C.W., Doetkott, C., Johnson, T.J., Nolan, L.K., 2005. Characterizing the APEC pathotype. *Vet Res*, 36, 241-256.
- Schulz, H. (1999). The world population of the White Stork (*Ciconia ciconia*) Results of the 5th International White Stork Census 1994/95. En, H. Schulz (Ed.): – White Storks on the up?, pp. 351-365 Proceeding of the International Symposium on the White Stork (Hamburg, 1996). NABU. Bonn.
- Smith, W.A., Mazet, J.A. K., & Hirsh, D. C., 2002. Salmonella in California wildlife species: Prevalence in rehabilitation centers and characterization of isolates. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 33(3), 228-235.
- Stallknecht, D.E. 2007. Impediments to wildlife disease surveillance, research, and diagnostics. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 315, 445–461.
- Stenzel, T., Tykałowski, B., Mazur-Lech, B., & Koncicki, A., 2008. Infections in wildlife birds - results of serological screening. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 52(1), 63-66.
- Stitt, T., J. Mountfield, And C. Stephen., 2007. Opportunities and obstacles to collecting wildlife disease data for public health purposes: Results of a pilot study on Vancouver Island, British Columbia. *Canadian Veterinary Journal*, 48, 83–90.
- Swayne, D.E., Senne, D.A., Beard, C.W., 1998. Avian Influenza en A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens. 4th

edition (Swayne, D.E., Glisson, J.R., Jackwood, M.W., Pearson, J.E., Reed, W.N., eds.), American Association of Avian Pathologists, Kennett Square, PA, pp.150-155.

- Tizard, I., 2004. Salmonellosis in wild birds. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, 13(2), 50-66.
- Tortosa, F.S., Caballero, J.M. & Reyes-López, J., 2002. Effect of rubbish dumps on breeding success in the White Stork in Southern Spain. *Waterbirds*, 25, 39-43.
- Tucker, G.M. And Evans, M.I., 1997. Habitats for birds in Europe: a conservation strategy for the wider environment. BirdLife Conservation Series, 6. BirdLife International. Cambridge.
- Vázquez, B., Esperón, F., Neves, E., López, J., Ballesteros, C., & Muñoz, M.J., 2010. Screening for several potential pathogens in feral pigeons (*Columba livia*) in Madrid. *Acta Vet Scand*, 52, 45.
- Vergara, P., Aguirre, J.I. & Fernández-Cruz, M., 2004. Fidelidad a los sitios y fenología en la invernada de la Cigüeña Blanca (*Ciconia ciconia*) en la Comunidad de Madrid (1998-2002). *Anuario Ornitológico de Madrid*, 2003, 74-85.
- Vlahovic, K., Matica, B., Bata, I., Pavlak, M., Pavićić, Z., Popović, M., Nejedli, S., Dovič, A., 2004. Campylobacter, Salmonella and Chlamydia in free living birds of Croatia. *Eur. J. Wildl. Res*, 50, 127–132.
- Wells, S.J., Fedorka-Cray, P.J., Dargatz, D.A., Ferris, K., Green, A., 2001. Fecal shedding of *Salmonella spp.* by dairy cows on farm at cull cow markets. *J Food Protection*, 64, 3-11.
- Wendell, M.D., Sleeman, J.M., & Kratz, G., 2002. Retrospective study of morbidity and mortality of raptors admitted to the Colorado State University Veterinary Teaching Hospital during 1995–1998. *Journal of Wildlife Disease*, 38, 101–106.

- Wobeser, G.A., 2006. Essentials of disease in wild animals. Blackwell, Ames, Iowa, 243 pp.
- Woolhouse, M.E.J., 2002. Population biology of emerging and re-emerging pathogens. Trends in Microbiology, 10 (10), S3-S7.