



**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN RECURSOS CINEGÉTICOS  
(IREC)**

**JCMM – UCLM – CSIC**

**MÁSTER UNIVERSITARIO EN INVESTIGACIÓN BÁSICA Y APLICADA EN  
RECURSOS CINEGÉTICOS.**

**TRABAJO FIN DE MÁSTER**

**Factores que determinan la presencia de Paramyxovirus aviar -1 en aves  
silvestres y cinegéticas.**

José Francisco Lima Barbero

Vº Bº Tutor: Úrsula Höfle Hansen

Tema: Enfermedades de las aves silvestres

Noviembre 2014

---

## Contenido

1. Resumen y palabras clave.....	2
2. INTRODUCCIÓN.....	4
2.1. La Enfermedad de Newcastle.....	4
2.1.1. Etiología.....	4
2.1.2. La Enfermedad de Newcastle en producción avícola.....	6
2.1.3. La infección por aPMV-1 en aves silvestres.....	7
2.1.4. Enfermedad de Newcastle como zoonosis.....	9
2.2. La perdiz roja como modelo de estudio.....	9
2.2.1. Importancia ecológica.....	9
2.2.2. Importancia económica.....	10
2.2.3. Importancia sanitaria.....	10
2.3. Objetivos.....	11
3. Material y métodos.....	11
3.1. Área y periodo de estudio.....	11
3.2. Toma de muestras.....	12
3.3. Análisis serológico.....	13
3.3.1. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ELISA.....	13
3.3.2. Inhibición de la hemaglutinación.....	14
3.3. Análisis molecular.....	14
3.3.1. Extracción de ARN.....	14
3.3.2. RT-PCR a Tiempo Real.....	15
3.4. Encuestas.....	16
3.5. Análisis estadístico.....	17
4. Resultados.....	18
4.1. Detección de genoma viral.....	18
4.2. Seroprevalencia por especies.....	18
4.2. Efecto del manejo de perdiz roja sobre la seroprevalencia de aPMV-1.....	22
5. Discusión.....	25
6. Bibliografía.....	29
7. Conclusiones.....	33
8. Agradecimientos.....	34

## 1. Resumen y palabras clave.

En este estudio se pretende describir y entender la epidemiología de Paramyxovirus aviar (aPMV-1) en diferentes especies de aves a nivel nacional en la última década. Se analizaron 1194 sueros recogidos entre 2005 y 2014 en toda España pero principalmente en Castilla – La Mancha, de nueve especies diferentes: perdiz roja (*Alectoris rufa*), faisán común (*Phasianus colchicus*), gaviota patiamarilla (*Larus cachinans*), paloma bravía (*Columba livia*), paloma torcaz (*Columba palumbus*), tórtola turca (*Streptopelia decaocto*), urraca (*Pica pica*), zorzal común (*Turdus philomelos*) y cigüeña blanca (*Ciconia ciconia*) mediante ELISA para la detección de anticuerpos frente al aPMV-1. La seroprevalencia media de aPMV-1 era de 15.7%, identificándose algunas especies como la paloma bravía y los Paseriformes con prevalencias significativamente más altas que el resto. Se observó una tendencia temporal a reducirse la seroprevalencia a lo largo de los años y un marcado efecto estacional, siendo invierno y otoño las estaciones con mayores seroprevalencias, posiblemente ligado a una mayor presencia y agregación de aves invernantes, por ejemplo columbiformes migratorias. Dado el aprovechamiento cinegético y manejo intensivo de la perdiz roja se evaluaron factores relacionados con la exposición de la misma a aPMV-. La seroprevalencia de aPMV-1 en perdices provenientes de cotos en los que solo existen poblaciones naturales es significativamente menor que en perdices muestreadas en granjas y en cotos en los que se realiza suelta de animales. Por otra parte las seroprevalencias de aPMV-1 muestran la misma variación estacional que las seroprevalencias en aves silvestres en general. Mediante la Inhibición de Hemaglutinación (IHA) se observaron títulos medios y altos de anticuerpos hemaglutinantes en perdices rojas seropositivas. Sin embargo no se detectó genoma viral de aPMV-1 mediante RT-PCR a tiempo real en los hisopos orales y cloacales tomados de las perdices. Estos resultados reflejan la circulación continua de aPMV-1 en España y la exposición de la perdiz roja al virus, además de un posible efecto de su manejo sobre esta exposición.

Palabras clave: aves silvestres, Paramyxovirus aviar 1, aPMV-1, Newcastle disease, perdiz roja *Alectoris rufa*, seroprevalencia.

## 2. INTRODUCCIÓN.

De entre las enfermedades víricas compartidas entre aves silvestres y domésticas, una de las de mayor relevancia es la Enfermedad de Newcastle (Alexander, 2001).

### 2.1. La Enfermedad de Newcastle.

#### 2.1.1. Etiología.

La enfermedad de Newcastle (ND, por sus siglas en inglés) es también conocida como Enfermedad de Ranikhet, Neumoencefalitis aviar, Enfermedad de Newcastle exótica (END, por sus singlas en inglés), pseudo-fowl pest, pseudovogel-pest, atypsiche Geflugelpest, pseudo-poultry plague, peste aviar, avian distemper y Enfermedad de Tetelo (Miller and Koch, 2013).

El agente etiológico de la ND es un miembro de la familia *Paramyxoviridae* del género *Avulavirus*.(Alexander, 2000; Swayne and King, 2003; OIE, 2013). Hay once serotipos de paramyxovirus aviar, siendo el serotipo I (aPMV-1) el responsable de causar la enfermedad de Newcastle, más concretamente por cepas virulentas de este serotipo (Aldous and Alexander, 2008; OIE, 2013).

La virulencia de las cepas del aPMV-1 o virus de la enfermedad de Newcastle (NDV, por sus siglas en inglés) es definido por un índice de patogenicidad intracerebral en pollitos de un día de 0.7 o mayor o por la demostración, bien directamente o por deducción, de la presencia de múltiples aminoácidos básicos en el C terminal de la proteína F2 y una fenilalanina en el residuo 117 del genoma del virus (Miller and Koch, 2013).

La infección por NDV se ha descrito en 241 especies. Si bien, algunas especies requieren mayores dosis infectivas que otras,

dependiendo también de la cepa de NDV (Miller and Koch, 2013). Y son tan solo 17 países en los que no se ha declarado nunca la presencia de enfermedad de Newcastle (OIE).

Aunque no es extrapolable para otras especies, se ha establecido una clasificación de los NDV en cepas acorde a los signos clínicos y lesiones que producen en gallinas infectadas (Alexander, 1995):

- Velogénicas viscerotrópicas: forma altamente patogénica en la que se encuentran hemorragias en aparato digestivo con frecuencia.
- Velogénicas neurotrópicas: con alta mortalidad, generalmente tras signos respiratorios y nerviosos.
- Mesogénicas: esta cepa causa signos respiratorios y, ocasionalmente, nerviosos pero asociada a una baja mortalidad.
- Lentogénica o respiratoria: que cursa con una infección respiratoria leve o inaparente.

La transmisión es horizontal por vía feco-oral. Las aves infectadas liberan el virus en secreciones provenientes de orofaringe y por las heces y las aves susceptibles se infectan al inhalar o ingerir el virus (Capua and Alexander, 2009; Miller and Koch, 2013). La transmisión vertical es difícil de determinar con exactitud, ya que el pollito puede infectarse al romper la cáscara contaminada por heces, pero se ha observado que algunas cepas de NDV muestran cierto tropismo por el oviducto al igual que virus vacunales se han detectado en órganos reproductores tras vacunación (Miller and Koch, 2013). El virus también puede ser transmitido por humanos vía fómites contaminados, por aves migratorias o ilegalmente importadas, y se ha reportado que las moscas pueden actuar como vectores mecánicos (Alexander et al., 1998; Chakrabarti et al., 2007; Miller and Koch, 2013).

El periodo de incubación tras una infección, si bien depende de varios factores, oscila entre 2 y 15 días, con un tiempo medio de 5-6 días y un periodo máximo de 4 semanas tras la exposición. Transcurrido el periodo de incubación se instauran signos clínicos que pueden variar desde infecciones inaparentes a una mortalidad del 100% dependiendo de la cepa y la inmunidad del hospedador (Miller and Koch, 2013).

Los signos clínicos varían según la virulencia de la cepa, la especie aviar infectada y la predilección del virus infectante bien por los aparatos respiratorios y digestivo o bien por el sistema nervioso central SNC (Swayne and King, 2003).

### **2.1.2. La Enfermedad de Newcastle en producción avícola.**

En muchos países ND está considerada, en producción avícola, como la enfermedad vírica de mayor relevancia y principal factor limitante al aumento de la producción (Alexander, 2001; Hafez, 2005; Alexander et al., 2012). A la vez que resulta muy complicado determinar la prevalencia a nivel global (Hafez, 2005). Es, junto al virus de Influenza Aviar altamente patógena, enfermedad de declaración obligatoria de la OIE (OIE, 2010).

En países desarrollados que cuentan con una producción avícola altamente industrializada las graves pérdidas económicas que origina esta enfermedad no se deben exclusivamente a la desaparición de la producción sino también a los costes que conlleva la implementación de rigurosas medidas de control tras un brote, como bioseguridad y vacunación, y el dinero invertido en mantener el estado de país o región libre de ND (Hafez, 2005; Miller and Koch, 2013). Ya que, según la Directiva 92/66/EEC, cuando la presencia de la enfermedad se haya confirmado oficialmente en una explotación, todas las aves de esa explotación deben ser sacrificadas y destruidas al igual que todo aquel material que haya podido estar en contacto, seguido de una campaña

vacunal, al igual que el establecimiento de una zona de vigilancia limitando la producción (Hafez, 2005).

Sin embargo, el impacto mayor posiblemente tenga lugar sobre la crianza de traspatio de pollos (Alexander, 2001; Miller and Koch, 2013). En ciertos países en desarrollo la ganadería de traspatio es una fuente muy importante de proteína, en forma de huevos y carne y donde, unido a la falta de medidas preventivas y de control, la enfermedad de Newcastle puede llegar a matar al 90% de los pollos de una región(Alexander, 2001; Miller and Koch, 2013).

En la reunión ad hoc de la OIE sobre vigilancia de la Enfermedad de Newcastle celebrada en 2006 se amplió la definición de aves de corral para extenderla a las aves de gallineros particulares y de caza o volatería (gallos de pelea) ya que esta clase de aves, con independencia de los fines para que se utilicen, suponen uno de los mayores factores de propagación de la ND debido a su alta susceptibilidad y gran secreción de virus una vez infectadas. Como ejemplo se citan, los brotes registrados en Italia en el año 2000 y en EE.UU. entre 2002 y 2003 que fueron debidos, en gran medida, a estos gallineros particulares y cinegéticos.

El último caso declarado de ND en España fue declarado en el País Vasco en 2009 en una granja cinegética, se dio por oficialmente controlado en 2010 y conllevó la destrucción de 7225 aves. (OIE)

### **2.1.3. La infección por aPMV-1 en aves silvestres.**

Se ha demostrado que aPMV-1 puede afectar, de manera natural o experimental, a más de 230 especies de aves (USGS Biological Resources Division, 1999).



Es usual el aislamiento de aPMV-1 en aves acuáticas siendo consideradas como reservorios y posibles vectores (Alexander, 2001; Hoque et al., 2012; Kapczynski et al., 2013). Sin embargo hay diferencias considerables en la susceptibilidad de diferentes especies. Como en comorán orejado (*Phalacrocorax auritus*) se ha comprobado, tras los brotes registrados en los años 1990 que continúan hasta la actualidad (White et al., 2014) en América del Norte, que es altamente patógeno para juveniles de esta especie (Alexander, 2001).

El comercio de aves psitácidas favoreció la introducción del virus en California a inicios de los años 70 (Alexander, 2001). Estas aves son capaces de excretar grandes cantidades de virus en ausencia de signos clínicos. Si bien parecen ser reservorios de aPMV-1 en los trópicos (Alexander et al., 2012) las aves responsables de los brotes resultaron infectadas posteriormente a la captura (Alexander, 2001).

Las palomas además ser susceptibles a todas las cepas de NDV, también son infectados por una cepa específica de especie (pPMV1) (Alexander, 2001). Esta cepa emergió en palomas silvestres y fue la responsable de brotes de mortalidad entre palomas bravías y otras columbiformes, que afectaron a toda Europa entre 1980 y 1990. (Alexander, 2001; Alexander et al., 2012).

El pPMV-1 también fue identificado como causante de brotes en faisanes (*Phasianus colchicus*) en Reino Unido y Dinamarca en 1996 y fue causado por el virus proveniente de palomas de carreras (Alexander et al., 1998; Alexander, 2001).

Las cigüeñas blancas (*Ciconia ciconia*) también se ha descrito estar implicadas en la epidemiología de aPMV-1 (Kaleta and Kummerfeld, 1983) al aislar aPMV-1 en ellas (Kaleta and Kummerfeld, 2012).

#### **2.1.4. Enfermedad de Newcastle como zoonosis.**

El primer caso documentado de una infección por NDV en humanos fue en 1942 como consecuencia de un accidente laboral. Desde entonces los casos más frecuentes han sido en personal técnico de laboratorio, veterinarios o empleados de plantas de procesado (Miller and Koch, 2013).

Los signos clínicos en humanos son conjuntivitis unilateral autolimitante con posible inflamación de los nódulos linfáticos preauriculares. En ocasiones se han descrito signos leves de infección generalizada como fiebre leve, escalofríos, dolor de cabeza y faringitis como consecuencia a una exposición aerógena. (Capua and Alexander, 2009; Miller and Koch, 2013).

## **2.2. La perdiz roja como modelo de estudio.**

### **2.2.1. Importancia ecológica.**

La perdiz roja (*Alectoris rufa*) es un ave Galliforme que pertenece a la familia *Phasianidae*. Puede habitar gran variedad de hábitats pero selecciona preferentemente zonas abiertas con agricultura poco intensiva o cobertura arbustiva media (Buenestado et al., 2008).

Se trata de un endemismo mediterráneo del suroeste de Europa que también ha sido introducido en Inglaterra, islas del Atlántico (Azores, Canarias, Madeira) y con poco éxito en EE.UU., Nueva Zelanda y Europa Central (Blanco-Aguilar et al., 2004).

Juega un papel clave, junto con el conejo de monte (*Oryctolagus cuniculus*) en la cadena trófica mediterránea, actuando como presa de la mayoría de los depredadores ibéricos (Duarte and Vargas, 2001).

### 2.2.2. Importancia económica.

La perdiz roja constituye, junto con el conejo en la especie de caza menor mejor valorada en España. Supone, además, una fuente de ingresos importante en algunas regiones como Andalucía, Castilla-La Mancha y Extremadura, especialmente donde otros usos agrarios tienen una relevancia marginal (Vargas and Guerrero, 2006). A pesar de todo, las poblaciones de perdiz roja están en retroceso, experimentando una disminución del 16.2 % desde 1998 a 2012 (SEO 2013). Por lo que la estrategia de los gestores de caza para contrarrestar esta disminución consiste en la suelta masiva de ejemplares criados en cautividad, principalmente en granjas industrializadas de ciclo cerrado que permitan producir muchos animales al menor coste posible (González-Redondo et al., 2010; Caro et al., 2014).

La mayor parte de las granjas de aves cinegéticas producen perdiz roja (*Alectoris rufa*), seguida a mucha distancia de faisán (*Phasianus colchicus*), codorniz (*Coturnix sp.*) y ánade azulón (*Anas platyrhynchos*). La mayor parte del mercado está controlada por relativamente pocos productores, que cuentan con explotaciones industriales registradas como explotaciones avícolas. No obstante, existe una cantidad no determinada pero importante de explotaciones pequeñas que escapan a las estadísticas oficiales. En 2009 existían unas 669 granjas cinegéticas de perdiz roja, de las que 444 estaban registradas en el REGA (Armenteros et al., 2013). Todas estas granjas están concentradas en 5 Comunidades Autónomas: Cataluña, Extremadura, Castilla-La Mancha, Castilla y León y Andalucía, que resultan ser las comunidades, junto con la Comunidad Valenciana, con mayor número de capturas (García-Abad and Vargas, 2009; MAGRAMA, 2012).

En España se soltaron 2.337.897 perdices de las cuales tan sólo 1.236.887 ejemplares procedían de granjas reguladas (MAGRAMA, 2012).

### 2.2.3. Importancia sanitaria.

La perdiz roja es susceptible a la infección por APMV1 (Aldous et al., 2010). Este hecho junto con los sistemas de producción mayoritarios, que albergan cientos de ejemplares en instalaciones con cuestionables sistemas de bioseguridad y voladeros expuestos al contacto con aves silvestres, son factores que propician el posible contagio (González-Redondo et al., 2010; Aldous et al., 2010).

Varios trabajos han descrito amplias diferencias en la flora bacteriana y parasitaria entre perdices de poblaciones silvestres y procedentes de granjas cinegéticas, y en algunos casos también está descrita la transmisión de parásitos a poblaciones silvestres de perdiz roja mediante la suelta de animales provenientes de granjas (Millán et al., 2004; Villanúa et al., 2007; Díaz-Sánchez et al., 2011). Al igual que su supervivencia post-suelta puede verse reducida al encontrarse con patógenos a los cuales no ha estado expuesta (Villanúa et al., 2007; Díaz-Sánchez et al., 2011).

### **2.3. Objetivos.**

El presente estudio pretende investigar en qué medida las perdices silvestres y las producidas en granjas cinegéticas están expuestas a la infección aPMV-1. El objetivo es tanto determinar posibles fuentes de infección, factores que pueden influir en la prevalencia y posibles consecuencias de la presencia del virus en la especie.

## **3. Material y métodos**

### **3.1. Área y periodo de estudio.**

La parte principal del estudio se ha llevado a cabo en la Comunidad Autónoma de Castilla-La Mancha (UTM: 30S 294,348–681,063 4,208,706–4,575,340). El clima es mediterráneo continental, caracterizado por una sequía estival, lluvias en primavera y otoño (con una media anual en los últimos 10 años de 359 mm) y una temperatura media de 14.63º C. El hábitat se

caracteriza por zonas montañosas, con una altitud máxima de 2274m, con bosque y matorral mediterráneo junto con áreas llanas (altitud mínima de 244m) bien de dehesa con encinas, quejigos y olivares o bien de cultivos predominantemente cerealistas.

Las granjas de perdiz roja que se han incluido en el estudio están localizadas en las provincias de Toledo, Ciudad Real y Albacete. Los cotos de caza menor (con y sin suelta), se sitúan principalmente en las provincias de Cádiz, Toledo y Ciudad Real.

Respecto a las otras especies estudiadas, el muestreo abarca la Península Ibérica el cual se ha organizado en 5 bio-regiones según Muñoz et al. (2010). (Figura 1).

Las muestras analizadas fueron tomadas en un periodo comprendido entre los años 2005 y 2014.

### **3.2. Toma de muestras.**

Las muestras analizadas se han obtenido de dos formas diferentes:

- Muestreo activo: muestras recogidas de forma directa en granjas, ojeos o capturas de aves.
- Muestreo pasivo: muestras obtenidas de aves remitidas al IREC por particulares u otros organismos.

De todas las aves se recogió una muestra de sangre obtenida por punción de la vena braquial o yugular, según tamaño del ave, mediante aguja y jeringa estériles y transferida a un tubo con anticoagulante heparina de litio para su posterior procesado. También se tomaron muestras duplicadas de orofaringe y cloaca mediante hisopos de algodón estériles de las cuales, una de las muestras de orofaringe y otra de cloaca, fueron inmediatamente colocadas en crioviales independientes que contienen 1 ml de medio específico para transporte de virus (solución de Hank balanceada que contiene glicerol 10%, 200 U/ml de penicilina, 200 µg/ml de estreptomicina, 100 U/ml de sulfato de polimixina B, 250 µg/ml de gentamicina y 50 U/ml nistatina, según Munster

et al., 2007). Las otras copias también se introdujeron en crioviales con medio de transporte para virus pero agrupadas de 5 en 5 animales, formando *pools* de orofaringe y de cloaca por separado. Las muestras se transportaron refrigeradas hasta el laboratorio para ser procesadas en un lapso de tiempo menor de 8 horas desde la recogida.

Las muestras de sangre se centrifugaron 9 minutos a 3000 rpm para separar el plasma del componente celular, éste se almacenó a -20° C hasta su análisis. Los hisopos en el medio de Hanks se almacenaron a -80° C hasta su análisis.

### 3.3 Análisis serológico.

#### 3.3.1. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ELISA

El suero de cada ave fue analizado para detectar la presencia de anticuerpos frente al aPMV-1 mediante ELISA. Para este análisis se eligió un ELISA de competición comercial para la detección de anticuerpos frente a la proteína HN del NDV en sueros aviares y yema de huevo (ID Screen Newcastle Disease Competition, IDvet, Montpellier, Francia) y se utilizó conforme a las instrucciones del fabricante. Se analizaron un total de 1194 sueros mediante ELISA (Tabla 1).

Tabla 1: Número de sueros por especie y año.

Especie	Nombre científico	Año										N
		2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	
Perdiz Roja	<i>Alectoris rufa</i>	34	2	108	92	10	117	20	2	-	167	552
Faisán común	<i>Phasianus colchicus</i>	21	3	-	7	22	22	14	16	-	-	105
Gaviota patiamarilla	<i>Larus cachinans</i>	-	-	-	-	-	46	-	-	-	-	46
Paloma bravía	<i>Columba livia</i>	-	2	27	-	1	-	-	-	-	-	30
Paloma torcaz	<i>Columba palombus</i>	-	-	3	44	-	-	-	-	-	-	47
Tórtola turca	<i>Streptopelia decaocto</i>	-	4	5	18	-	-	-	-	-	-	27
Paseriformes		3	66	4	-	-	-	-	-	-	-	73
Cigüeña blanca	<i>Ciconia ciconia</i>	-	-	-	-	-	-	103	-	116	95	314
	N	58	77	147	161	33	185	137	18	116	262	1194

### **3.3.2. Inhibición de la hemaglutinación.**

De los 78 sueros de perdiz positivos a NDV en ELISA, 38 fueron sometidos a la prueba de inhibición de la hemoaglutinación.

La prueba de Inhibición de la Hemaglutinación (IH) es la prueba considerada confirmativa para la detección de anticuerpos contra el NDV de las aves (OIE, 2014).

La técnica se realizó siguiendo las indicaciones recogidas en el Manual sobre animales terrestres de la OIE (2008). Para ello se realizó inicialmente una prueba de hemoaglutinación, utilizando antígeno viral inactivado sobre una dilución al 1% de eritrocitos de gallina, previamente identificada como seronegativa frente a NDV. Mediante esta prueba se determinaron las unidades hemaglutinantes (HAU) que poseía la suspensión vírica (Antigen NDV ULSTER 2 C, Veterinary Laboratories Agency, New Haw, Addlestone, UK).

Para prevenir hemoaglutinaciones inespecíficas, los sueros se inactivaron durante 30 minutos a 56 °C. A continuación, siguiendo las directrices del Manual de los Animales Terrestres de la OIE (2008), se enfrentaron diluciones seriadas en base 2 a las 4 HAU víricas y se incubaron 30 minutos a 20 °C. El título de IH es la mayor dilución de suero que causa inhibición completa de la hemoaglutinación. Los títulos pueden considerarse positivos si hay inhibición a una dilución del suero de 1/16 (OIE, 2008). Generalmente, títulos de 1/32 o superiores suelen considerarse protectores frente a la infección (Kapczynski et al., 2013)

### **3.3. Análisis molecular.**

#### **3.3.1. Extracción de ARN.**

El ARN de los hisopos, de orofaringe y cloaca, se extrajo mediante un kit comercial (NucleoSpin® TriPrep, Macherey-Nagel GmbH & Co.,Düren, Alemania). En primer lugar se procedió a mezclar mediante agitación con vórtex el criovial que contenía el hisopo y el medio de transporte de virus con la finalidad de extraer la mayor cantidad de muestra posible del algodón de la torunda. A continuación se centrifugó cada criovial a 14000 rpm durante 5

minutos para concentrar la mayor cantidad de material orgánico posible en la fracción inferior del tubo y se traspasaron 200µl de la solución a un nuevo tubo estéril para proceder a la extracción de su material genético. Para la extracción se siguió el protocolo de extracción para cultivos celulares y tejidos proporcionado por el fabricante del kit ([http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure\\_Bio/Protocols/RNA%20and%20mRNA/UM\\_TotalDNARNAProtein.pdf](http://www.mn-net.com/Portals/8/attachments/Redakteure_Bio/Protocols/RNA%20and%20mRNA/UM_TotalDNARNAProtein.pdf)).

El ADN extraído se congeló a -80 °C para futuros estudios. El ARN se conservó a -80 °C hasta su análisis. El material genético extraído se cuantificó mediante espectrofotometría (Nanodrop® Spectrophotometer ND-1000, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EEUUSA) para comprobar que se encontraban en cantidad y calidad suficiente para su análisis.

Como control positivo de la PCR se empleó ARN de una muestra de paloma torcaz con infección confirmada de APMV-1 extraído con High Pure RNA Isolation kit (Roche Diagnostics GmbH, Alemania).

### **3.3.2. RT-PCR a Tiempo Real.**

Siguiendo el protocolo descrito por *Creelan et al., 2002* se incluyeron 2.5µl de ARN en una RT-PCR a tiempo real para la amplificación de la secuencia de la región del punto de restricción de la proteína de fusión (F). En la mezcla de reacción de 25µl se utilizó 1µl de solución (10pmol/µl) de cada uno de los cebadores NDV F (4829 5'-GGTGAGTCTATCCGGARGATACAAG-3' 4893) y NDV R (5031 5'-TCATTGGTTGCRGCAATGCTCT-3' 5008), , 12.5 µl de Master Mix (Quantitect SYBR® Green RT-PCR Kit, Qiagen GmbH, Alemania), 0.25 µl de RT polimerasa (Quantitect SYBR® Green RT-PCR Kit, Qiagen GmbH, Alemania) y 7.75 µl de agua estéril libre de nucleasas.

La RT PCR en tiempo real se realizó en un termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen GmbH, Alemania) siguiendo las condiciones especificadas por *Creelan et al., 2002* y que consisten en un ciclo de transcripción de 30 min a 50° C seguido de un ciclo de 15min a 95° y 45 ciclos compuestos por ciclos de 94° C por 15 segundos, 30 segundos a 48°C, 30 segundos a 72° C y 15 segundos a



77° C, finalizando con una única fase de “melting” que, en 6 segundos, pasa de 55 a 95° C.

Se analizaron un total de 174 *pool*es de 5 ejemplares cada uno.

### 3.4. Encuestas.

Durante las visitas a las explotaciones productoras de aves cinegéticas se realizaron encuestas a los responsables de las mismas. Las preguntas fueron diseñadas principalmente para identificar factores de riesgo en la transmisión de la enfermedad y están recogidas en la tabla 1.

Tabla 1: Resumen de las preguntas y respuestas de las encuestas realizadas a los responsables de las explotaciones muestreadas.

Pregunta	Respuestas recogidas
Otras aves presentes en la explotación	Presencia
	Ausencia
Otras especies presentes	Presencia / ausencia
Tipo de explotación	Reproductores / cría / engorde / ciclo cerrado
Alojamiento de reproductores	Ausencia / jaula / suelo
Alojamiento cría	Suelo / yacija
Granja avícola más cercana	<500 m / 500-1000 / >1000 m
Aves migratorias	Presencia / ausencia
Concentración aves acuáticas cerca	Presencia / ausencia
Vallado perimetral	Presencia / ausencia
Vado sanitario	Presencia / ausencia
Entrada de vehículos	Entra / no entra
Uso ropa exclusiva en la explotación	Presencia / ausencia
Tela pajarera	Presencia / ausencia
Tela mosquitera	Presencia / ausencia
Depósitos impermeables	Presencia / ausencia
Origen de las aves	Propia explotación / explotación de cría / pollitos de 1 día / silvestres
Destino de las aves	Ojeos / repoblación y venta / engorde

Visita a otras explotaciones	Presencia / ausencia
Visitas externas	Presencia / ausencia
Participación en ferias	Presencia / ausencia
Destino cadáveres	Cremación / carroñeros
Limpieza y desinfección incubadoras	Presencia / ausencia
Limpieza y desinfección jaulas	Presencia / ausencia
Limpieza y desinfección parques	Presencia / ausencia
Origen agua	Pozo particular / suministro general
Controles sanitarios al agua	Presencia / ausencia
Almacenamiento pienso	Palet / suelo / silo
Control sanitario	Presencia / ausencia
Problemas coccidios	Presencia / ausencia
Muertes por goteo	Presencia / ausencia
Mortandades	Presencia / ausencia
Problemas plumaje	Presencia / ausencia

### 3.5. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó con el programa IBM® SPSS® Statistics v.20. Se emplearon estadísticos descriptivos (frecuencias) para la exploración de los datos relacionados con la variable respuesta (Positivos/Negativos APMV1) y regresiones logísticas binarias para la exploración de las variables explicativas obtenidas en las encuestas. Como un primer paso, Previamente a la realización del modelo, se evaluó la variable manejo y las seroprevalencias de cada granja con las respuestas obtenidas de las encuestas con pruebas de chi-cuadrado y de Fisher. Seguidamente se realizaron 2 modelos mixtos lineales generalizados (GLMM) debido a la estructuración espacial del muestreo, uno para el estudio comparativo multiespecie y otro para el estudio de los factores relacionados con la presencia de APMV-1 en perdices provenientes de diferentes manejos. Ambos son modelos con distribución binomial (codificado como 0 para muestras negativas y 1 para muestras positivas) y función de enlace logit. Ambos modelos fueron (i) obtenidos mediante un procedimiento de selección “paso hacia adelante” con el menor AIC (Akaike, 1974) y (ii) validados mediante la comparación entre los valores

observados frente a la probabilidad pronosticada por los modelos mediante una prueba de U de Mann-Whitney (umbral de significación  $p < 0,05$ ).

En el estudio multiespecie se incluyeron los resultados de ELISA de 1194 aves. El número de individuos por especie y año se encuentra recogido en la Tabla 2. Como variable aleatoria se introdujo la variable Finca/Granja para corregir el posible sesgo por la agrupación espacial de nuestro muestreo.

El modelo mixto lineal generalizado realizado exclusivamente con perdices incluyó las variables Año y Estación, además del tipo de Manejo (origen de las perdices). Se introdujo la variable Finca/Localidad como variable aleatoria. El nivel de significancia estadística considerado para todos los análisis fue del 95% ( $p < 0,05$ )

La comparación de las seroprevalencias entre los diferentes manejos de las perdices se realizó mediante test de Chi-cuadrado (umbral de significación  $p < 0,05$ ).

## **4. Resultados**

### **4.1. Detección de genoma viral**

No se detectó genoma de aPMV-1 en ninguna de las muestras analizadas.

### **4.2. Seroprevalencia por especies**

En el conjunto de muestras se detectó una seroprevalencia de aPMV-1 de 16,8% (N=1194) (Figura 1).

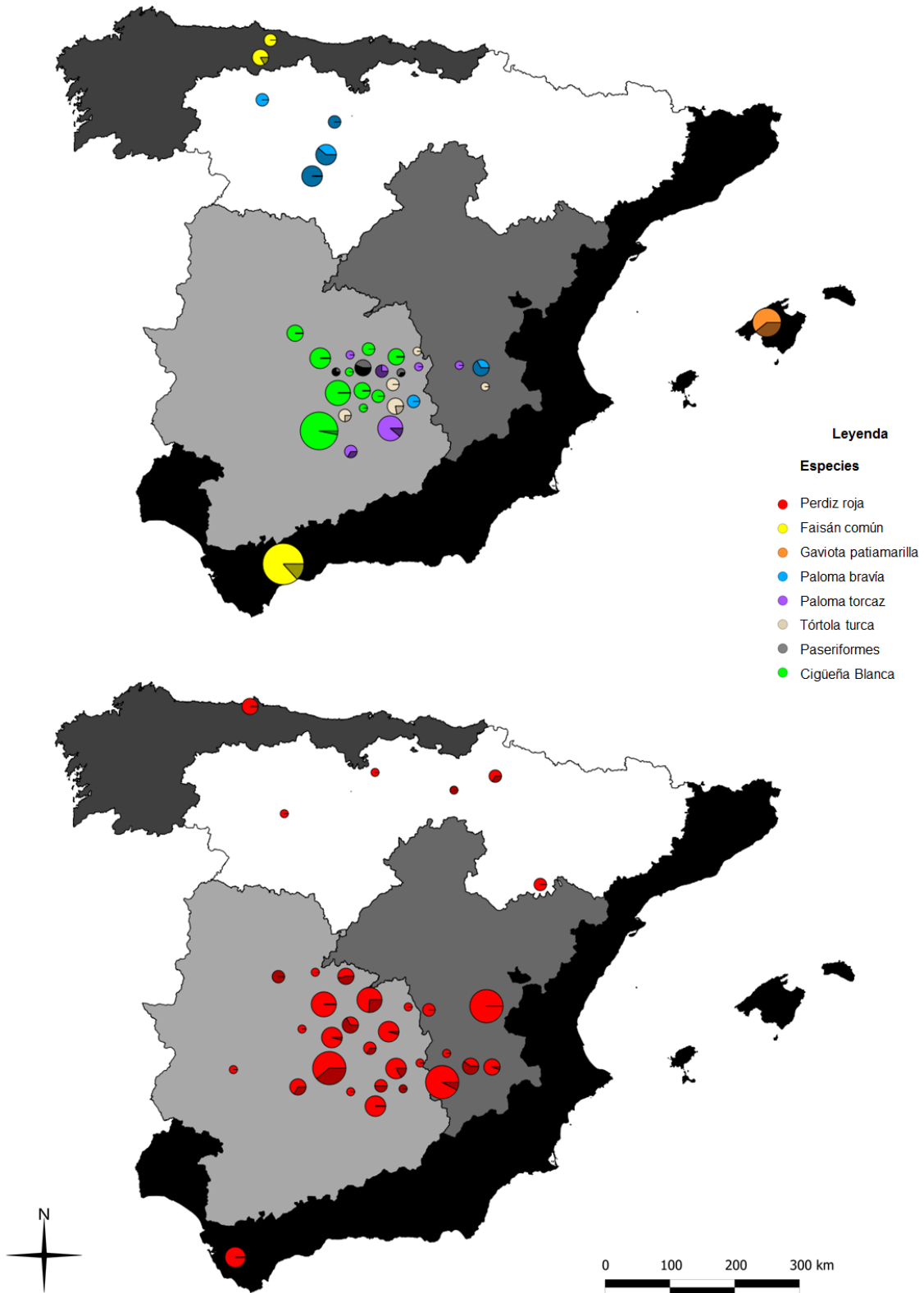


Figura 1: Puntos de muestreo (Tamaño del diagrama proporcional a tamaño muestral (N), y seroprevalencia de aPMV-1 (zona sombreada del círculo) en perdiz roja (b) y otras especies de aves (a) En el mapa se reflejan las Bioregiones en la que se dividió España con respecto a la epidemiología de enfermedades de animales silvestres (Muñoz et al., 2005)

A lo largo de los años de muestreo la seroprevalencia de aPMV-1 muestra una tendencia significativa (GLMM,  $p=0,002$ ,  $\beta=-0,243$ ) a reducirse (Figura 2).

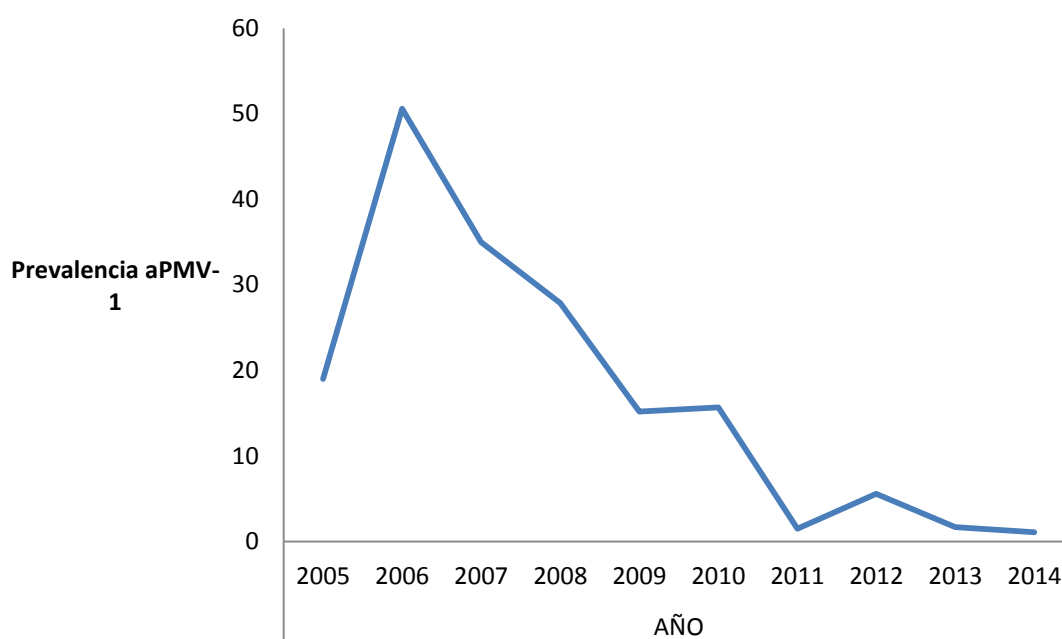


Figura 2: Prevalencia de anticuerpos frente aPMV-1 durante periodo de estudio.

Existen diferencias significativas en la seroprevalencia de aPMV.1 entre especies (GLMM,  $p=0,034$ ,  $F=2,171$   $df=7$ ) (Figura 3). De entre las 8 especies incluidas en el estudio, la paloma bravía (GLMM,  $p=0,005$ ,  $\beta=2,566$ ,  $SE=0,921$ ) y los paseriformes (GLMM,  $p=0,018$ ,  $\beta=2,254$ ,  $SE=0,952$ ) mostraron seroprevalencias significativamente mayores que la perdiz roja. Debido a que las muestras de paseriformes se encuentran agrupadas en el tiempo, se enfrentaron a las perdices de los correspondientes años en un test de chi-cuadrado, observando diferencias significativas ( $\chi^2_{test}= 16,421$ ,  $df=1$ ,  $p<0,05$ ), descartando de este modo que las diferencias se deban a un sesgo temporal.

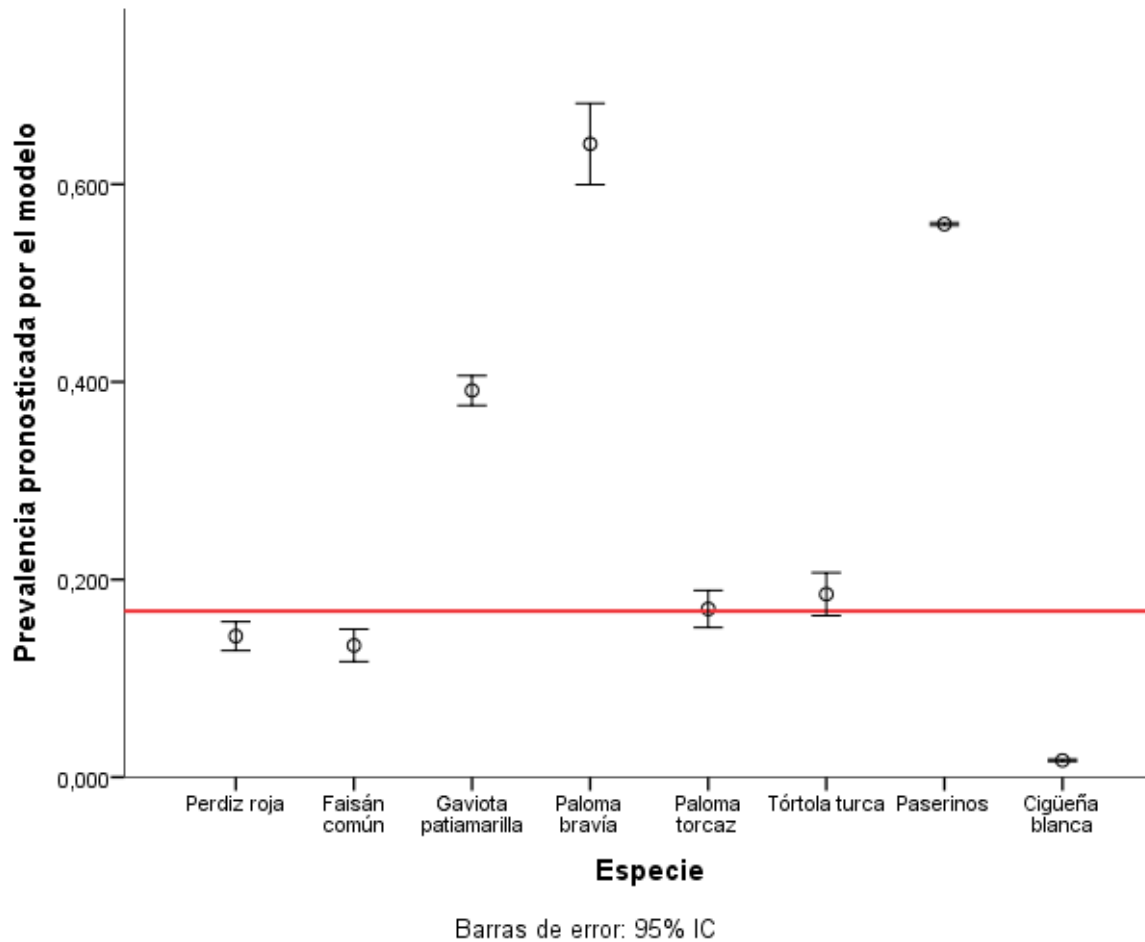


Figura 3: Prevalencia de aPMV-1 pronosticada por el modelo multiespecie. Se incluye prevalencia media (16.8%, línea roja)

Si bien, la gaviota patiamarilla también muestra una seroprevalencia mayor que la perdiz, sin embargo, las diferencias no son significativas (GLMM,  $p=0,08$ ,  $\beta=3,281$ ,  $SE=1,892$ ) debido a la corrección por la variable espacial.

La seroprevalencia de aPMV-1 varía significativamente entre estaciones (GLMM,  $p<0,005$ ,  $F=6,465$ ,  $df=3$ ) (Figura 4). Invierno es la estación con una mayor prevalencia (24,7%, 45 de 182) seguida por otoño (24,3 %; 37 de 152; GLMM,  $p=0,006$ ,  $\beta=-1,141$ ,  $SE=0,413$ ), primavera (18.3 %; 78 de 504; GLMM,  $p=0,001$ ,  $\beta=-1,694$ ,  $SE= 0,528$ ) y fue el verano el que presentó una prevalencia menor (7.9 %; 28 de 356 GLMM,  $p<0.005$ ,  $\beta=-1.65$ ).

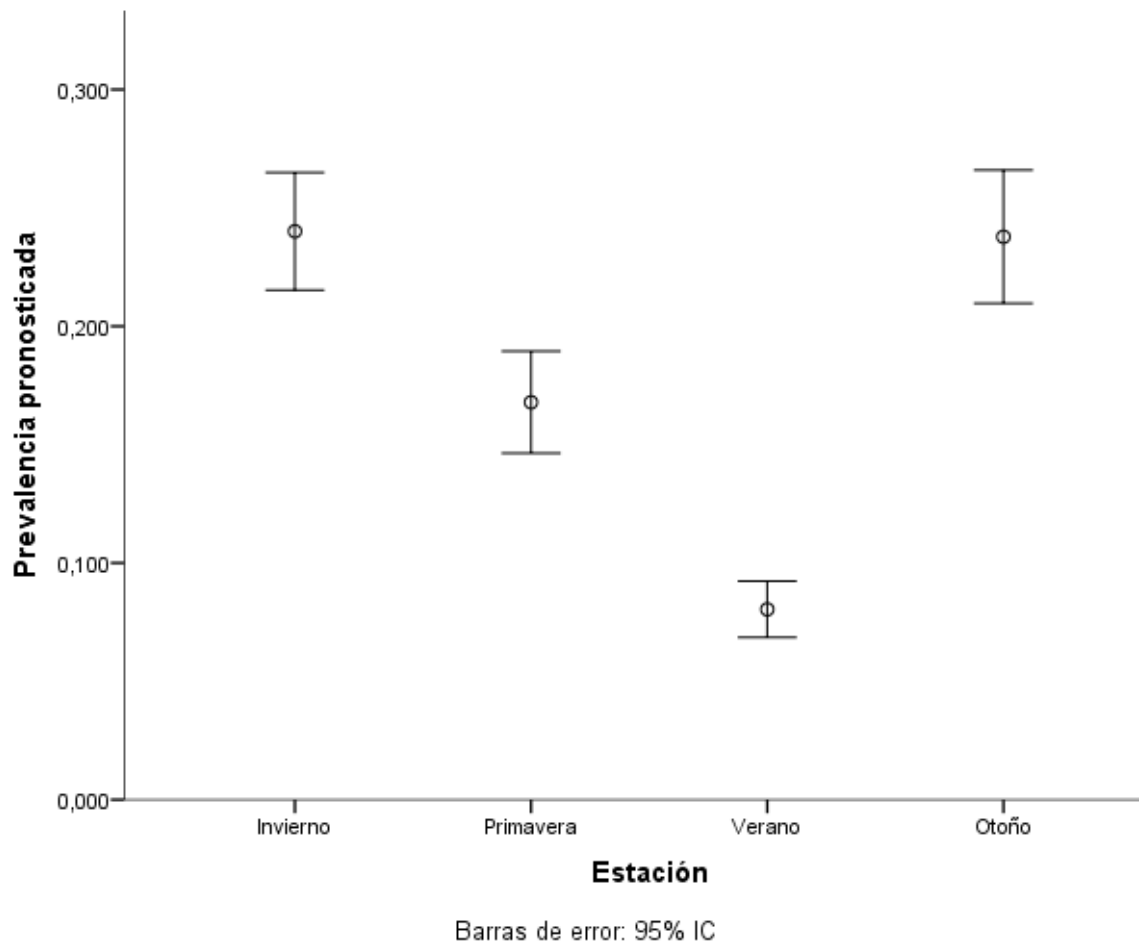


Figura 3: Seroprevalencia en ELISA por estación de aPMV-1 en 1094 aves muestreadas entre 2005 y 2014

No se observaron diferencias entre bioregiones en la seroprevalencia de aPMV-1.

#### 4.2. Efecto del manejo de perdiz roja sobre la seroprevalencia de aPMV-1

La seroprevalencia de aPMV-1 en cotos en los que no se producen sueltas de perdices (4,3%, 4 de 93) es significativamente menor que la detectada en granjas de perdices (14,8%; 57 de 385;  $\chi^2_{test} = 7,424$ ,  $df=1$ ,  $p < 0,05$ ) y la seroprevalencia en perdices procedentes de cotos en los que se liberan perdices (21,9%; 16 de 73;  $\chi^2_{test} = 11,978$ ,  $df=1$ ,  $p < 0,05$ ) (Figura 4).

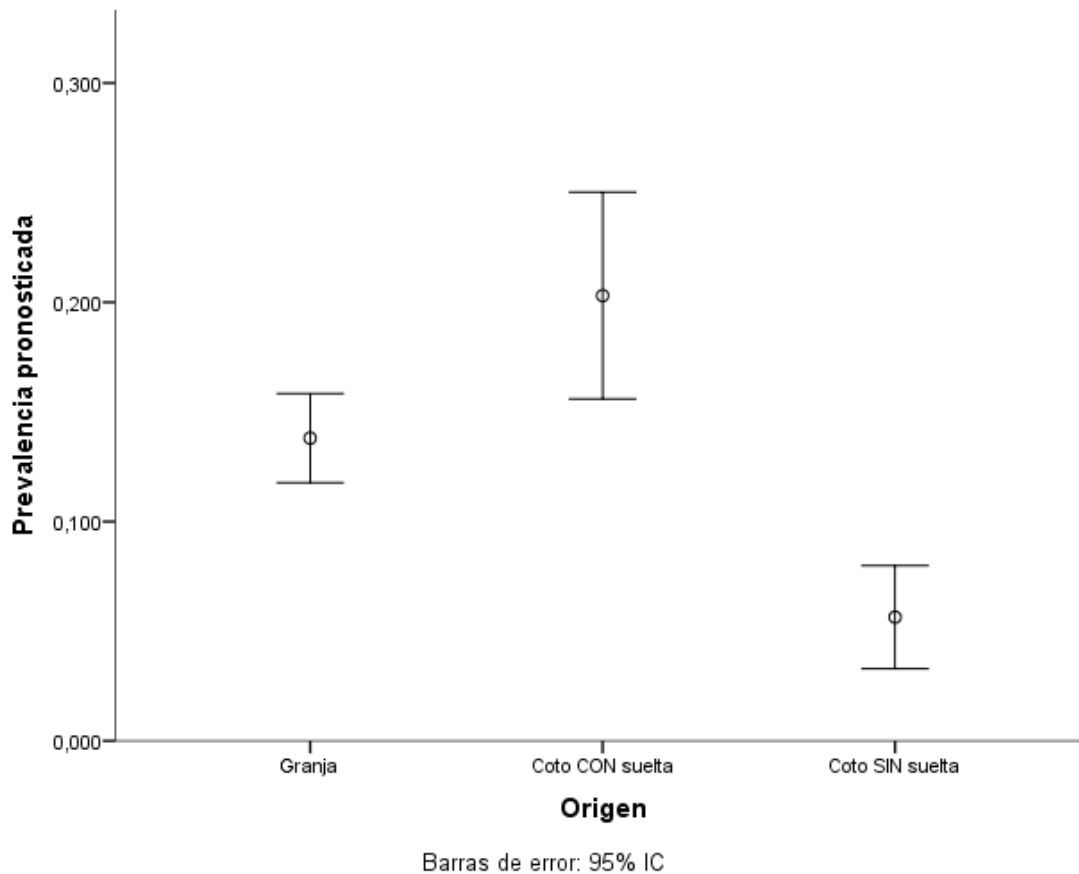


Figura 4: Seroprevalencia de aPMV-1 en perdiz roja procedente de diferentes manejos (Granja, coto con suelta, coto sin suelta) .

Al igual que en las otras especies la seroprevalencia de aPMV-1 en perdices varía también estadísticamente significativamente entre estaciones (GLMM,  $p < 0,001$ ,  $F = 9,543$ ,  $df = 3$ ) (Figura 5). Siendo la seroprevalencia especialmente alta en invierno (29,4%, xx de 126), seguida por otoño (24,2%; GLMM,  $p < 0,001$ ,  $\beta = -2,406$ ,  $SE = 0,541$ , xx de 128). Ya más bajas son las seroprevalencias en verano (3,8%; GLMM,  $p < 0,001$ ,  $\beta = -3,499$ ,  $SE = 0,932$ , xx de 239) y primavera (0%; GLMM,  $p = 0,982$ , 0 de 58). La falta de significancia para la reducción de p estadística en primavera puede estar relacionada con el tamaño muestral de esta estación por las limitaciones encontradas en la toma de muestras al tratarse de época de reproducción.



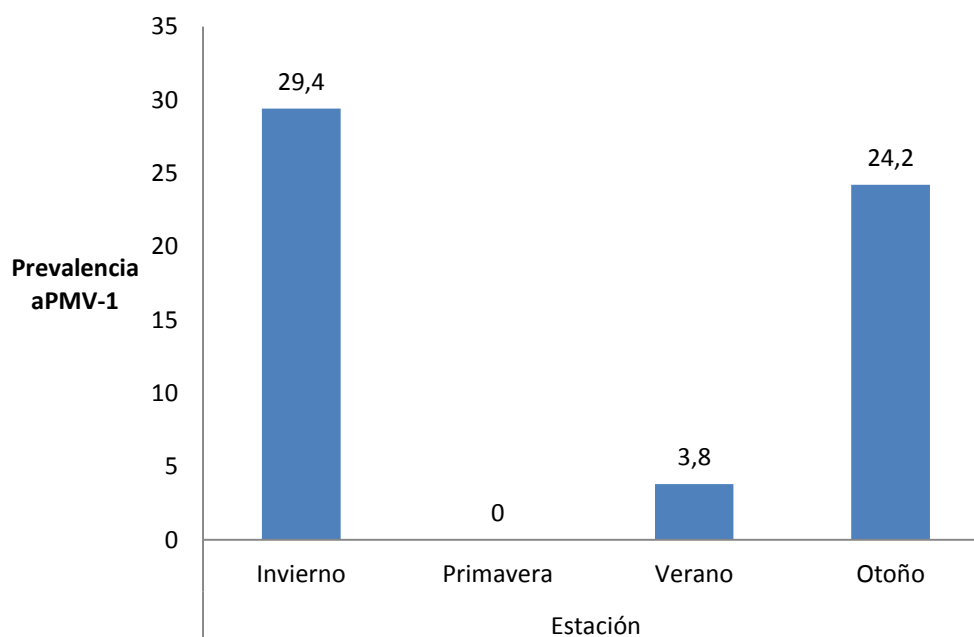


Figura 5: Variación estacional de seroprevalencia de aPMV-1 en perdiz roja según estaciones.

Al igual que en modelo multiespecies la seroprevalencia de aPMV-1 en perdices parece reducirse a lo largo de los años (GLMM,  $p=0,001$ ,  $\beta= -0,444$ ,  $SE= 0.13$ ).

La distribución de los títulos de anticuerpos frente a NDV en las perdices se observa en la Tabla 2.

Tabla 2: Título de anticuerpos frente a aPMV-1 en perdiz roja.

	Título de anticuerpos						
	<1/16	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	>1/256
Granja	12	1	4	3	6	2	5
CCS <sup>1</sup>	2	-	-	3	1	-	-
CSS <sup>2</sup>	-	-	-	-	-	-	-
N	14	1	4	6	7	2	5

<sup>1</sup> CCS: Coto con suelta <sup>2</sup> Coto sin suelta

De las nueve granjas muestreadas siete tenían perdices con anticuerpos frente a aPMV-1 (Tabla 3).

Tabla 3: Prevalencias de anticuerpos frente aPMV-1 en diferentes granjas de perdiz roja.

	GRANJA								
	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9
N (pos/muestreados)	1/19	0/63	5/65	8/64	0/30	25/65	8/12	1/25	0/19
Seroprevalencia (%)	5,5	0	7,7	12,5	0	39,1	66,7	4	0

## 5. Discusión.

Los resultados de este estudio muestran que aPMV-1 circula entre las aves de toda la Península y en todas las especies analizadas. Existen pocos trabajos en los que se describa la presencia de aPMV-1 en especies no domésticas a nivel nacional. Nuestros resultados difieren de los hallados por Maldonado et al. (1994), quienes sólo detectaron anticuerpos frente aPMV-1 en aves acuáticas, y de los resultados de Höfle et al. (2001) quienes también constataron la ausencia de anticuerpos en perdices. No obstante, estudios más recientes demuestran la presencia de anticuerpos frente aPMV-1 en rapaces (Höfle et al., 2002) y en paloma bravía (Esperón et al., 2014). Además hay que tener en cuenta que los estudios de Maldonado et al. Y Höfle et al., 2001 y 2002 se realizaron mediante IH siendo posiblemente más específico que el ELISA empleado en el presente estudio o el trabajo de Esperón et al. (2014).

Se demostró una tendencia estadísticamente significativa a la disminución en la seroprevalencia de aPMV-1 durante el período de estudio y una estadísticamente significativa marcada estacionalidad en la presencia de anticuerpos frente a dicho virus. Además se identificaron seroprevalencias de aPMV-1 significativamente más altas en algunas especies.

Aunque no hay notificaciones de Enfermedad de Newcastle en España desde 2010, las diferentes pero presentes seroprevalencias observadas demuestran la circulación del virus aPMV-1 a nivel nacional. Si bien esta

circulación tiene lugar en especies donde no se realiza vigilancia epidemiológica o no es obligatoria la declaración del brote (Bonfante et al., 2012).

La seroprevalencia en paloma bravía resultó ser la más elevada (64.5 %) entre las especies estudiadas. Estos datos concuerdan con el estado enzoótico que presenta el virus en esta especie (Capua and Alexander, 2009; Esperón et al., 2014). Si bien la seroprevalencia descrita por Esperón et al, (2014) es del 42.9 %, esta diferencia puede deberse a la presencia de palomas provenientes de brotes en nuestras muestras.

Las prevalencias de anticuerpos en las otras dos especies estudiadas pertenecientes al Orden Columbiformes: paloma torcaz (17%) y tórtola turca (18.5%), son menores que la de la paloma bravía y se encuentran en torno a la prevalencia media observada. Estos resultados demuestran que aPMV-1, como entalía (Bonfante et al., 2012), está circulando entre todas las Columbiformes en nuestro país, lo cual difiere de la ausencia de anticuerpos en paloma torcaz observada por Maldonado et al. (1994).

A pesar de haber mucha información sobre la prevalencia de aPMV-1 en aves acuáticas, la información en gaviotas es muy limitada. A pesar de que la seroprevalencia frente aPMV-1 obtenida en gaviota patiamarilla (39,1%, 18 de 46) se encuentra concentrada a nivel geográfico y temporal y debe tratarse con cautela, ésta es superior, aunque no estadísticamente significativa, a la seroprevalencia media observada. Este resultado invita a estudiar más en profundidad este grupo de aves, incluyendo otras referencias geográficas (costa e interior peninsular) y otras especies, ya que se ha detectado diferencias en la susceptibilidad entre diferentes especies de gaviotas (Coffee et al., 2010).

El grupo de passeriformes, constituido por urracas y zorzales, mostró la segunda prevalencia más alta (56,2 %, 41 de 73). Si bien los passerinos no son generalmente considerados como factores importantes en la epidemiología del aPMV-1 (Schnebel et al., 2005; Krapez et al., 2010) se ha descrito la presencia de pPMV-1 en mirlo (Krapez et al., 2010) y en petirrojo (Monne et al., 2006).

Tanto palomas y tórtolas, como Paseriformes como urracas, zorzales, gorrión y estorninos son aves que frecuentan las inmediaciones de las explotaciones de aves cinegéticas. Y considerando descripciones anteriores de transmisión del virus por parte de algunas de estas especies hacia aves cinegéticas (Aldous and Alexander, 2008), consideramos que deberían ser tenidas en cuenta como posibles fuente de infección.

La prevalencia observada en perdiz roja (14.1%) contrasta con los resultados de dos estudios realizados en perdices rojas en Andalucía en 1993 y 1996, en el que no se detectaban anticuerpos hemaglutinantes (Maldonado et al., 1994; Höfle et al., 2001). En faisán hemos encontrado una prevalencia similar a la de la perdiz roja (13.3%) a pesar de haberse descrito en la literatura científica un mayor número de brotes de la enfermedad que en perdiz (Aldous and Alexander, 2008; Aldous et al., 2010).

La cigüeñas muestran la prevalencia de anticuerpos frente aPMV-1 más baja de entre las especies estudiadas (1.6 %). Kaleta et al, 1983 describe que, como especie migradora adaptada a hábitats humanizados, podría jugar un papel en la epidemiología. Sin embargo, nuestros resultados y la ausencia de anticuerpos mostrados por Esperón et al, 2014, hacen pensar en esta especie como una posible especie centinela antes que estar implicada en brotes de aPMV1.

La tendencia temporal regresiva observada parece coincidir con las escasas notificaciones recientes en avicultura en España y en Europa. Pero difiere de lo descrito por White et al. (2014) quien ha observado un aumento de los brotes de aPMV-1 en cormoranes de E.E.U.U. en la última década. Sin embargo esta tendencia necesita ser contrastada ya que carecemos de datos sobre las especies más seroprevalentes en los últimos años.

La marcada estacionalidad observada puede estar ligada, como en otras especies, a los patrones migratorios de las aves. Invierno y otoño resultaron ser las estaciones estadísticamente significativas con mayores seroprevalencias frente aPMV-1 y es en estas épocas del año cuando se concentran en nuestro país un gran número de aves invernantes. Este efecto fue claramente patente en los brotes de aPMV-1 en tórtolas turcas en Italia (Terregino et al., 2003;

Bonfante et al., 2012). Factores implicados en este recrudecimiento de la presencia de la enfermedad pueden estar relacionados con una mayor transmisión ligada a un mayor contacto entre aves en dormideros o por una mayor susceptibilidad debido a los efectos de la migración.

El contacto con aves silvestres también puede estar implicado con las mayores prevalencias de aPMV-1 observadas en las perdices de granja y aquellas provenientes de cotos con suelta. Las seroprevalencias observadas en las granjas de aves cinegéticas pueden ser explicadas por diversos factores, como una alta densidad de aves, en ocasiones de diferentes orígenes, que facilita la transmisión o aves silvestres portadoras que, aprovechando carencias en bioseguridad, accedan a las instalaciones y contaminen agua o pienso con sus heces (Davis-Fields and Allison, 2014).

La mayor incidencia de enfermedades en cotos en los que se liberan perdices ya ha sido comprobada con otros patógenos (Villanúa et al., 2007; Díaz-Sánchez et al., 2011) pero no se ha estudiado teniendo en cuenta enfermedades víricas. En el caso de aPMV-1 también se observa una mayor prevalencia de anticuerpos frente al virus pero el mecanismo de transmisión no está bien definido y requiere un estudio más profundo. Una posible explicación es que en los cotos se sueltan perdices, provenientes de granjas con ya cierta seroprevalencia, en gran número lo que facilita el contacto con otras aves, como palomas o paserinos, y resultar infectadas.

Una posible explicación para las bajas seroprevalencia observadas en los cotos sin suelta puede ser un menor contacto con otras aves y entre perdices ligada a menores densidades.

A pesar de haber obtenido una seroprevalencia del 14%, que demuestra el contacto con el virus, no se detectó genoma de aPMV-1 en ninguno de los hispos tomados de perdiz roja. La presencia de anticuerpos sin aislamiento del agente puede deberse a la infección por cepas de baja patogenicidad (Kruckenberg et al., 2011; Marks et al., 2014).

- 1- En base a la encuestas realizadas se pudo identificar que las granjas con mayores seroprevalencias mostraban algún tipo de deficiencia en

medidas de bioseguridad como la presencia de otras aves en la explotación, ausencia de tela pajarera y/o mosquitera, carecer de vallado perimetral en la finca y de vado sanitario o mantener contacto con otras explotaciones a través de visitas externas a la explotación o del personal a otras explotaciones. No obstante, son resultados preliminares que necesitan de un mayor tamaño muestral para permitirnos su análisis y correlación con otros factores.

## 6. Bibliografía.

- ALDOUS, E. W., AND D. J. ALEXANDER. 2008. Newcastle disease in pheasants (*Phasianus colchicus*): a review. *Veterinary journal* (London, England : 1997) 175: 181–5.
- ALDOUS, E. W., J. K. MYNN, R. M. IRVINE, D. J. ALEXANDER, AND I. H. BROWN. 2010. A molecular epidemiological investigation of avian paramyxovirus type 1 viruses isolated from game birds of the order Galliformes. *Taylor & Francis. Avian pathology : journal of the W.V.P.A* 39: 519–24. Retrieved November 26, 2014, from <http://dx.doi.org/10.1080/03079457.2010.530938>.
- ALEXANDER, D. 2000. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Revue Scientifique et Technique (OIE)* 19 (2), 443-462.
- ALEXANDER, D. J. 1995. The epidemiology and control of avian influenza and Newcastle disease. *Journal of Comparative Pathology* 112: 105–126.
- ALEXANDER, D. J. 2001. Gordon Memorial Lecture. Newcastle disease. *British poultry science* 42: 5–22..
- ALEXANDER, D. J., E. W. ALDOUS, AND C. M. FULLER. 2012. The long view: a selective review of 40 years of Newcastle disease research. *Taylor & Francis. Avian pathology : journal of the W.V.P.A* 41: 329–35.
- ALEXANDER, D. J., H. T. MORRIS, W. J. POLLITT, C. E. SHARPE, R. L. ECKFORD, R. M. Q. SAINSBURY, L. M. MANSLEY, R. E. GOUGH, AND G. PARSONS. 1998. Newcastle disease outbreaks in domestic fowl and turkeys in Great Britain during 1997. *BMJ Publishing Group Limited. Veterinary Record* 143: 209–212.
- ARMENTEROS, J. A., J. Á. BARASONA, M. BOADELLA, P. ACEVEDO, C. GORTÁZAR, AND J. VICENTE. 2013. Una propuesta para considerar aspectos sanitarios

- en la regulación cinegética. Retrieved November 24, 2014, from <http://revistaecosistemas.net/index.php/ecosistemas/article/view/724>.
- BLANCO-AGUIAR, J. A., E. VIRGÓS, AND R. VILLAFUERTE. 2004. Perdiz roja. *In Atlas de las aves reproductoras de España*.
- BONFANTE, F., C. TERREGINO, A. HEIDARI, I. MONNE, A. SALVIATO, R. TADDEI, E. RAFFINI, AND I. CAPUA. 2012. Identification of APMV-1 associated with high mortality of collared doves (*Streptoelia decaocto*) in Italy. *The Veterinary record* 171: 327. Retrieved November 26, 2014, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22915679>.
- BUENESTADO, F. J., P. FERRERAS, M. DELIBES-MATEOS, F. S. TORTOSA, J. A. BLANCO-AGUIAR, AND R. VILLAFUERTE. 2008. Habitat selection and home range size of red-legged partridges in Spain. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 126: 158–162.
- CAPUA, I., AND D. J. ALEXANDER (EDS.). 2009. *Avian Influenza and Newcastle Disease*. Springer Milan, Milano.
- CARO, J., M. DELIBES-MATEOS, J. VICENTE, AND B. ARROYO. 2014. A quantitative assessment of the release of farm-reared red-legged partridges (*Alectoris rufa*) for shooting in central Spain. *European Journal of Wildlife Research*. Retrieved October 13, 2014, from <http://link.springer.com/10.1007/s10344-014-0861-9>.
- CHAKRABARTI, S., D. J. KING, C. AFONSO, D. SWAYNE, C. J. CARDONA, D. R. KUNEY, AND A. C. GERRY. 2007. Detection and Isolation of Exotic Newcastle Disease Virus from Field-Collected Flies. *Journal of Medical Entomology* 44: 840–844.
- COFFEE, L. L., B. A. HANSON, M. P. LUTTRELL, D. E. SWAYNE, D. A. SENNE, V. H. GOEKJIAN, L. J. NILES, AND D. E. STALLKNECHT. 2010. Avian paramyxoviruses in shorebirds and gulls. *Wildlife Disease Association. Journal of wildlife diseases* 46: 481–7. Retrieved November 23, 2014, from <http://jwildlifedis.org/doi/abs/10.7589/0090-3558-46.2.481>.
- DAVIS-FIELDS, M., AND A. ALLISON. 2014. Effects of Temperature and pH on the Persistence of Avian Paramyxovirus-1 in Water. *Journal of wildlife* .... Retrieved November 26, 2014, from <http://www.jwildlifedis.org/doi/abs/10.7589/2014-04-088>.
- DÍAZ-SÁNCHEZ, S., A. M. MORIONES, F. CASAS, AND U. HÖFLE. 2011. Prevalence of *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. and *Campylobacter* sp. in the intestinal flora of farm-reared, restocked and wild red-legged partridges (*Alectoris rufa*): is restocking using farm-reared birds a risk? *European Journal of Wildlife Research* 58: 99–105.
- DUARTE, J. AND VARGAS, J.M. 2001. Mamíferos predadores de nidos de perdiz roja (*Alectoris rufa*) en olivares del sur de España. *Galemys* 12.

- ESPERÓN, F., B. VÁZQUEZ, A. SÁNCHEZ, J. FERNÁNDEZ-PIÑERO, M. YUSTE, E. NEVES, V. NOGAL, AND M. J. MUÑOZ. 2014. Seroprevalence of Paramyxoviruses in Synanthropic and Semi-Free-Range Birds. American Association of Avian Pathologists 953 College Station Road, Athens, GA 30602-4875. Retrieved November 22, 2014, from <http://www.aaapjournals.info/doi/abs/10.1637/10689-101113-ResNote.1>.
- GARCÍA-ABAD, C., AND M. DE LA VARGA. 2009. Una visión sobre la avicultura para la producción de caza en España. Producción .... Retrieved November 24, 2014, from [http://www.aida-itea.org/aida-itea/files/itea/revistas/2009/105-3/ITEA\\_105-3.pdf#page=25](http://www.aida-itea.org/aida-itea/files/itea/revistas/2009/105-3/ITEA_105-3.pdf#page=25).
- GONZÁLEZ-REDONDO, P., M. DELGADO-PERTÍÑEZ, S. TORIBIO, F. A. RUIZ, Y. MENA, F. P. CARAVACA, AND J. M. CASTEL. 2010. Characterisation and typification of the red-legged partridge (*Alectoris rufa*) game farms in Spain. Retrieved November 24, 2014, from <http://revistas.inia.es/index.php/sjar/article/view/1258>.
- HAFEZ, H. M. 2005. Governmental regulations and concept behind eradication and control of some important poultry diseases. World's Poultry Science Journal 61: 569–582.
- HÖFLE, U., J. M. BLANCO, AND E. F. KALETA. 2002. Seroprevalence of Avian Paramyxovirus 1, 2, and 3 in Captive and Free-Living Birds of Prey in Spain (Preliminary Results). Annals of the New York Academy of Sciences 969: 213–216. Retrieved November 23, 2014, from <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04381.x>.
- HÖFLE, U., C. GORTÁZAR, E. ANGULO, E. F. KALETA, AND R. VILLAFUERTE. 2001. Serologische Untersuchungen zur Prävalenz von Antikörpern gegen aviäres Paramyxovirus der Serotypen 1, 2 und 3 bei frei lebenden Rothühnern (*Alectoris rufa*) in Südspanien. Springer. Zeitschrift für Jagdwissenschaft 47: 145–151. Retrieved November 23, 2014, from <http://digital.csic.es/handle/10261/57034>.
- HOQUE, M. A., G. W. BURGESS, D. KARO-KARO, A. L. CHEAM, AND L. F. SKERRATT. 2012. Monitoring of wild birds for Newcastle disease virus in north Queensland, Australia. Preventive veterinary medicine 103: 49–62.
- KALETA, E. F., AND N. KUMMERFELD. 1983. Herpesviruses and Newcastle disease viruses in white storks (*Ciconia ciconia*). Avian pathology : journal of the W.V.P.A 12: 347–52. Retrieved November 27, 2014, from [http://apps.webofknowledge.com/full\\_record.do?product=UA&search\\_mode=GeneralSearch&qid=1&SID=S1miMpOb2DU9gixMvEV&page=1&doc=5&cacheurlFromRightClick=no](http://apps.webofknowledge.com/full_record.do?product=UA&search_mode=GeneralSearch&qid=1&SID=S1miMpOb2DU9gixMvEV&page=1&doc=5&cacheurlFromRightClick=no).
- KALETA, E. F., AND N. KUMMERFELD. 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 an. Taylor & Francis. *Avian pathology : journal of the W.V.P.A* 41: 383–9. Retrieved November 27, 2014, from <http://dx.doi.org/10.1080/03079457.2012.696312>.
- KAPCZYNSKI, D. R., C. L. AFONSO, AND P. J. MILLER. 2013. Immune responses of poultry to Newcastle disease virus. *Developmental and comparative immunology* 41: 447–53.
- KRAPEZ, U., J. RACNIK, B. SLAVEC, AND A. STEYER. 2010. Detection and molecular characterization of a pigeon variant of avian paramyxovirus type 1 virus (PPMV-1) from a blackbird (*Turdus merula*). *Slov Vet Res*. Retrieved November 23, 2014, from [http://www.slovetres.si/files/pdf/volume2010/vol47\\_3/SlovVetRes\\_47\\_3.pdf#page=12](http://www.slovetres.si/files/pdf/volume2010/vol47_3/SlovVetRes_47_3.pdf#page=12).
- KRUCKENBERG, H., T. MÜLLER, C. FREULING, R.-U. MÜHLE, A. GLOBIG, H. SCHIRRMEIER, M. BUSS, T. HARDER, M. KRAMER, K. TESKE, K. POLDERDIJK, D. WALLSCHLÄGER, AND A. HLINAK. 2011. Serological and virological survey and resighting of marked wild geese in Germany. *European Journal of Wildlife Research* 57: 1025–1032. Retrieved November 23, 2014, from <http://link.springer.com/10.1007/s10344-011-0514-1>.
- MAGRAMA. 2012. Estadística anual de caza.
- MALDONADO, A., A. ARENAS, M. C. TARRADAS, J. CARRANZA, I. LUQUE, A. MIRANDA, AND A. PEREA. 1994. Prevalence of antibodies to avian paramyxoviruses 1, 2 and 3 in wild and domestic birds in southern Spain. Taylor & Francis. *Avian pathology : journal of the W.V.P.A* 23: 145–52. Retrieved November 26, 2014, from <http://dx.doi.org/10.1080/03079459408418981>.
- MARKS, F. S., C. R. RODENBUSCH, C. H. OKINO, H. E. HEIN, E. F. COSTA, G. MACHADO, C. W. CANAL, L. BRENTANO, AND L. G. CORBELLINI. 2014. Targeted survey of Newcastle disease virus in backyard poultry flocks located in wintering site for migratory birds from Southern Brazil. *Preventive veterinary medicine* 116: 197–202. Retrieved November 22, 2014, from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167587714001998>.
- MILLÁN, J., C. GORTAZAR, AND R. VILLAFUERTE. 2004. A COMPARISON OF THE HELMINTH FAUNAS OF WILD AND FARM-REARED RED-LEGGED PARTRIDGE. The Wildlife Society. *Journal of Wildlife Management* 68: 701–707. Retrieved November 24, 2014, from [http://dx.doi.org/10.2193/0022-541X\(2004\)068\[0701:ACOTHF\]2.0.CO;2](http://dx.doi.org/10.2193/0022-541X(2004)068[0701:ACOTHF]2.0.CO;2).
- MILLER, P. J., AND G. KOCH. 2013. Newcastle Disease. *In Diseases of Poultry*. pp. 89 – 107.
- OIE. 2010. Newcastle Disease. *In Terrestrial Animal Health Code*.
- OIE. 2013. Newcastle Disease. OIE Tchnical Disease Cards.

- SCHNEBEL, B., V. DIERSCHKE, S. RAUTENSCHLEIN, AND M. RYLL. 2005. No detection of avian influenza A viruses of the subtypes H5 and H7 and isolation of lentogenic avian paramyxovirus serotype 1 in passerine birds during stopover in the year 2001 on the island Helgoland (North Sea). *DTW. Deutsche tierärztliche Wochenschrift* 112: 456–60. Retrieved November 23, 2014, from <http://europepmc.org/abstract/MED/16425631>.
- SWAYNE, D., AND D. KING. 2003. Avian influenza and Newcastle disease. *Journal of the American Veterinary Association* 222 (11) 1534-1540.
- TERREGINO, C., G. CATTOLI, B. GROSSELE, E. BERTOLI, E. TISATO, AND I. CAPUA. 2003. Characterization of Newcastle disease virus isolates obtained from Eurasian collared doves (*Streptopelia decaocto*) in Italy. *Taylor & Francis. Avian pathology : journal of the W.V.P.A* 32: 63–8. Retrieved November 26, 2014, from <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0307945021000070732>.
- USGS BIOLOGICAL RESOURCES DIVISION. 1999. *Field Manual of Wildlife Diseases. General Field Procedures and Diseases of Birds.*
- VILLANÚA, D., L. PÉREZ-RODRÍGUEZ, F. CASAS, V. ALZAGA, P. ACEVEDO, J. VIÑUELA, AND C. GORTÁZAR. 2007. Sanitary risks of red-legged partridge releases: introduction of parasites. *European Journal of Wildlife Research* 54: 199–204. Retrieved November 24, 2014, from <http://link.springer.com/10.1007/s10344-007-0130-2>.
- WHITE, C., H. IP, AND C. METEYER. 2014. SPATIAL AND TEMPORAL PATTERNS OF AVIAN PARAMYXOVIRUS-1 OUTBREAKS IN DOUBLE-CRESTED CORMORANTS (*PHALACROCORAX AURITUS*) IN. *Journal of wildlife Diseases* 51 (1).

## 7. Conclusiones.

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- 1- El aPMV-1 circula en varias especies de aves silvestres en nuestro país.
- 2- Algunas de estas aves, mediante sus movimientos migratorios, parecen estar implicadas en la epidemiología del virus.

- 3- La implicación de aves migratorias en la epidemiología de aPMV-1 en España podría explicar el marcado carácter estacional que presentan las seroprevalencias.
- 4- Paseriformes y columbiformes pueden ser fuentes de infección para perdices.
- 5- La producción de perdiz roja en granjas y su suelta incrementa su exposición a Paramyxovirus aviar 1, posiblemente en relación a la agregación y la exposición a especies portadoras que frecuentan el perímetro de granjas y comederos en coto cinegéticos.

## **8. Agradecimientos.**

Agradecer a guardas, encargados, propietarios ganaderos y colegas de profesión que han prestado su valiosa colaboración.

Me gustaría agradecer a los motores de SABIOtec, Mariana y Christian, por la confianza depositada en mí desde el comienzo de mi andadura en el IREC.

A mi tutora, Úrsula Höfle por el apoyo y dedicación que emplea en mí.

A Andreia, a mis compañeros de master y chicos de prácticas que han ayudado en el trabajo de campo y largos ratos de laboratorio. Y a Mari Cruz por intentar poner orden en el caos que reina en mi cabeza.

Agradecer especialmente a Jose y a David su ayuda fundamental en este trabajo, en muchos otros y en otras tantas ideas un tanto peculiares que nos traemos día a día.

A mi incondicional familia y a Rocío por su significativamente comprobada paciencia.