



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Presencia de Portadores de *Salmonella* spp. *Campylobacter* spp.
y *Mycoplasma* spp. en Buitres Leonados (*Gyps fulvus*) Silvestres
en la Comunidad Valenciana

D. José Cristóbal Torres Ródenas
2017



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Presencia de portadores de *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. y *Mycoplasma* spp. en buitres leonados (*Gyps fulvus*) silvestres en la Comunidad Valenciana

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

José Cristóbal Torres Ródenas

Dirigida por:

Dra. Dña. Clara Marín Orenge

Dr. D. Christian De la Fe Rodríguez

Dr. D. Santiago Vega García

A mis hijos Andrea y Pablo, y a mis padres Eleuterio y Trinidad.

INDICE.

LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
LISTA DE FIGURAS.	3
LISTA DE TABLAS.	5
1. INTRODUCCIÓN.....	8
2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.	12
2.1. Características generales del buitre leonado (<i>Gyps fulvus</i>).	12
2.1.1. Clasificación taxonómica.....	13
2.1.2. Distribución geográfica.	14
2.1.2.1. Distribución y censo en Europa.....	15
2.1.2.2. Distribución y censo en España.	15
2.1.2.3. Distribución y censo en la CV.	19
2.1.3. Hábitos alimentarios del buitre leonado en España.....	22
2.1.4. Situación legal y grado de protección.....	25
2.2. Presencia de agentes infecciosos y parasitarios en el buitre leonado.	27
2.2.1. Parásitos.....	27
2.2.2. Agentes infecciosos: virus.....	28
2.2.3. Agentes infecciosos: hongos.	29
2.2.4. Agentes infecciosos: bacterias.....	29
2.3. Importancia de la presencia de portadores de <i>Campylobacter</i> spp., <i>Salmonella</i> spp. y <i>Mycoplasma</i> spp. en especies silvestres.	31
2.4. La infección por <i>Campylobacter</i> spp.....	32
2.4.1. Contexto histórico.	32
2.4.2. Taxonomía y características.	32
2.4.3. Aspectos clínico-epidemiológicos de la campilobacteriosis en la especie humana.	33
2.4.4. Las aves como fuente de infección de campilobacteriosis.	35
2.5. La infección por <i>Salmonella</i> spp.	37
2.5.1. Contexto histórico.	37
2.5.2. Taxonomía y características.	38
2.5.3. Aspectos clínico-epidemiológicos de la salmonelosis humana.....	40
2.5.4. Papel epidemiológico de las aves en la salmonelosis.	42
2.6. La infección por <i>Mycoplasma</i> spp.....	44
2.6.1. Contexto histórico de las micoplasmosis aviarias.	44
2.6.2. Taxonomía y características.	46
2.6.3. Micoplasmosis aviarias.....	47

2.6.4. El estatus sanitario de las aves necrófagas como factor colectivo: Interacción con las especies domésticas y la especie humana.	48
3. OBJETIVOS.....	54
4. MATERIAL Y MÉTODOS.	56
4.1. Experimento 1. Presencia de <i>Campylobacter</i> spp., <i>Salmonella</i> spp. y <i>Mycoplasma</i> spp. en el buitre leonado.....	56
4.1.1. Población y diseño.....	56
4.1.2. Análisis microbiológico de las muestras.....	59
4.1.2.1. Detección de <i>Campylobacter</i> spp.....	59
4.1.2.2. Detección de <i>Salmonella</i> spp.....	60
4.1.2.3. Detección de <i>Mycoplasma</i> spp.	61
4.1.2.3.1. Pruebas preliminares.....	61
4.1.2.3.2. Identificación bioquímica.....	62
4.1.2.3.2.1. Medios de Bioquímica.	62
4.1.2.3.2.2. Protocolos.	63
4.1.2.3.2.2.1. Fermentación de la glucosa.	63
4.1.2.3.2.2.2. Hidrólisis de la urea.....	63
4.1.2.3.2.2.3. Hidrólisis de la arginina.	64
4.1.2.3.2.2.4. Reducción del trifenil tetrazolium.....	64
4.1.2.3.2.2.5. Producción de películas y cristales.	64
4.1.2.3.3. Identificación molecular.	65
4.1.2.3.3.1. Extracción de ADN.	65
4.1.2.3.3.2. PCR para detectar <i>Mycoplasma</i> spp.	66
4.1.2.3.3.3. Secuenciación del gen <i>16sARNr</i>	67
4.1.3. Análisis estadístico.	68
4.2. Experimento 2. Fuentes de infección de <i>Salmonella</i> spp. del buitre leonado.....	68
4.2.1. Análisis microbiológico. Detección de <i>Salmonella</i> spp.	70
4.2.2. Estudio filogenético de las cepas.	70
4.2.3. Análisis estadístico.	71
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	74
5.1. Experimento 1. Presencia de <i>Campylobacter</i> spp., <i>Salmonella</i> spp. y <i>Mycoplasma</i> spp. en el buitre leonado.....	74
5.1.1. Estado sanitario de la población en estudio.	74
5.1.2. Presencia de <i>Campylobacter</i> spp., <i>Salmonella</i> spp. y <i>Mycoplasma</i> spp. en el buitre leonado.....	74
5.2. Experimento 2. Fuentes de infección de <i>Salmonella</i> spp. en el buitre leonado.....	85
6. CONCLUSIONES.....	94

7. RESUMEN.....	96
8. <i>ABSTRACT</i>	100
9. AGRADECIMIENTOS.....	104
10. BIBLIOGRAFIA.....	108
11. ANEXO 1.....	138
11.1. Composición de los medios SP4 líquido y sólido.....	138
11.2. Medio para la prueba de la fermentación de la glucosa.....	139
11.3. Medio para la prueba de la hidrólisis de la urea.....	139
11.4. Medio para la prueba de la hidrólisis de la arginina.....	139
11.5. Medio para la prueba de reducción del tetrazolium.....	140
11.6. Soluciones y tampones de extracción de ADN.....	140
11.7. Mezcla PCR (25µl).....	140
11.8. Proceso de amplificación. Termociclador.....	141
11.9. Secuencias de 6 cepas de micoplasma pertenecientes a cada uno de los cuatro perfiles bioquímicos.....	141

LISTA DE ABREVIATURAS.

µL	Micro litro
µm	Micrómetro
ASAP	Siglas en inglés de «medio cromogénico para determinación de <i>Salmonella</i> spp.»
BDB	Base de datos de la Biodiversidad. Generalitat Valenciana
BOE	Boletín Oficial del Estado
BPW	Siglas en inglés de «agua de peptona tamponada»
CDC	Siglas en inglés de «centro para el control y prevención de enfermedades»
CE	Comunidad Europea
CEE	Comunidad Económica Europea
cm	Centímetro
COI	Congreso Ornitológico Internacional
CV	Comunidad Valenciana
EEB	Encefalopatía Espongiforme Bovina
EEUU	Estados Unidos
EFSA	Siglas en inglés de «Agencia Europea de Seguridad Alimentaria»
ERIC	Siglas en inglés de «Secuencia consenso repetitiva intergénica bacteriana»
ES	Error estándar
FAO	Siglas en inglés de «organización para la alimentación y la agricultura»
FAPAS	Fondo para la Protección de los Animales Salvajes
FHV	Siglas en inglés de «Herpesvirus del halcón»
g	Gramos
GBS	Siglas en inglés de «síndrome de Guillain-Barre»
GLM	Siglas en inglés de «modelo lineal generalizado»
h	Horas
ISO	Siglas en inglés de «organización internacional de normalización»
LESRPE	Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial
mCCDA	Siglas en inglés de «agar modificado charcoal-cefoperazone-deoxycholate»
MER	Material Específico de Riesgo
min	Minutos
mL	Mililitros
MSRV	Medio modificado semi-sólido Rappaport Vassiliadis
n	Número de muestras
NVD	Siglas en inglés de «virus de la enfermedad de <i>Newcastle</i> »

°C	Grados Celsius
OHV	Siglas en inglés de «Herpesvirus del búho»
OIE	Siglas en inglés de «Organización Mundial de Sanidad Animal»
OMS	Organización Mundial de la Salud
P	Probabilidad
PCR	Siglas en inglés de «Reacción en Cadena de la Polimerasa»
rRNA	Siglas en inglés de «Ácido Ribonucleico Ribosómico»
SANDACH	Subproductos Animales No Destinados a Consumo Humano
SENB	Servicio de Espacios Naturales y Biodiversidad. Generalitat Valenciana
SEO	Sociedad Española de Ornitología
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirido
spp.	Especies (plural)
SVS	Servicio de Vida Silvestre. Generalitat Valenciana
UE	Unión Europea
UICN	Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza
UPGMA	Siglas en inglés de «Método de agrupamiento de pares con la media aritmética no ponderada»
VBNC	Siglas en inglés de «Viable pero no cultivable»
vol/vol	Volumen/volumen
XLD	Xilosa Lisina Desoxycolato

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1. Clasificación taxonómica de las rapaces, del COI de Campos do Jordão, Brasil 2011.....	14
Figura 2. Clasificación taxonómica del buitre leonado.....	14
Figura 3. Evolución de la población de buitre leonado en España. Número mínimo de parejas detectadas en cada año (Del Moral, 2009).....	18
Figura 4. Población reproductora (parejas) de buitre leonado en la CV (SVS, 2015a)	19
Figura 5. Población reproductora (parejas) de buitre leonado en Castellón (SVS, 2015a) ..	20
Figura 6. Población reproductora (parejas) de buitre leonado en Valencia (SVS, 2015a) ...	21
Figura 7. Población reproductora (parejas) de buitre leonado en Alicante (SVS, 2015a)	22
Figura 8. Trampa utiliza para capturar los buitres silvestres (<i>Gyps fulvus</i>) en el Muladar de Cincorres	57
Figura 9. ISO 10272-2:2006 (Anexo E). Esquema para la detección de <i>Campylobacter</i> spp.	59
Figura 10. ISO 6579:2002 (Anexo D). Esquema para la detección de <i>Salmonella</i> spp; BWP: Agua de Peptona Tamponada; MSRV: <i>Modified Semisolid</i> ; <i>Rappaport-Vassiliadis</i> ; XLD: agar <i>Xlose-Lysine- Desoxicolate</i> ; ASAP: agar cromogénico para la detección de <i>Salmonella</i> spp.	61
Figura 11. Esquema para la detección de <i>Mycoplasma</i> spp.....	62
Figura 12. Esquema de plan de muestreo durante las sesiones de septiembre y octubre de 2015	69
Figura 13. Dendrograma de la relación filogenética de las cepas de <i>Salmonella</i> spp. aisladas en buitres, cadáveres, casetas, vehículos y granjas de porcino. Los cuadros rojos agrupan los serotipos que presentan un perfil idéntico del 90%.....	88

LISTA DE TABLAS.

Tabla 1. Tamaño de la población del buitre leonado en España por comunidad autónoma. Se detalla el tamaño de población según su importancia y el porcentaje respecto al total. (del Moral, 2009)	16
Tabla 2. Evolución del nº de parejas de la población de Castellón (SVS, 2015 ^a)	20
Tabla 3: Subespecies de la especie <i>Salmonella entérica</i>	38
Tabla 4. Taxonomía de la Clase Mollicutes	46
Tabla 5: Cebadores específicos para la detección de <i>Mycoplasma</i> spp.	67
Tabla 6: Cebadores específicos para estudiar la secuencia del gen 16sARNr en Mollicutes	67
Tabla 7: Cebadores específicos para estudiar la secuencia del gen 16sARNr en <i>Salmonelas</i>	70
Tabla 8. Masa corporal y hematocrito en buitres leonados silvestres en función de la edad	74
Tabla 9. Porcentaje de ejemplares de buitre leonado <i>Salmonella</i> -positivo por edades	76
Tabla 10. Serovariantes de <i>Salmonella</i> spp. aisladas en buitres leonados	76
Tabla 11: perfiles bioquímicos de las cepas de <i>Mycoplasma</i> spp. aisladas	81
Tabla 12: comparación de las secuencias de los 4 perfiles bioquímicos en el GenBank....	82
Tabla 13. Porcentaje de muestras positivas a <i>Salmonella</i> spp.	86

1. INTRODUCCIÓN.

1. INTRODUCCIÓN.

La sanidad animal tiene un enorme impacto en la salud pública, la producción de alimentos, la economía y el medio ambiente. Los animales, y muy particularmente la fauna silvestre, se consideran el origen de más del 70% de todas las enfermedades emergentes. En consecuencia, la vigilancia sanitaria de la fauna silvestre es crítica para el control de esas enfermedades (Kuiken *et al.*, 2005).

Los animales silvestres interactúan con las especies domésticas y con el hombre, bien directa o indirectamente, en este contexto, se debe tener en consideración la interacción entre patógenos animales silvestres y domésticos, el medio ambiente y las actividades humanas, donde emergen nuevos patógenos o nuevos hospedadores, y donde los cambios en la densidad de población o en el comportamiento del hospedador pueden afectar a su presencia.

El aprovechamiento de restos cárnicos procedentes de la ganadería por las aves necrófagas les hace susceptibles de adquirir patógenos oportunistas o específicos presentes en las distintas especies ganaderas. Además, las aves carroñeras ingieren residuos de agentes antimicrobianos y otros medicamentos que contienen los cadáveres del ganado que consumen, con el consiguiente riesgo de problemas asociados con consecuencias sobre su salud que pueden causar disminuciones importantes en sus poblaciones (Oaks *et al.*, 2004). Un claro ejemplo fue el descenso de la población de buitres en el subcontinente indio entre 1992 y 2007, como resultado de la ingestión de diclofenaco, antiinflamatorio común de uso veterinario presente en los tejidos de cadáveres de ganado del que se alimentaron (Green *et al.*, 2004; Shultz *et al.*, 2004).

La forma en que estas aves obtienen gran parte de su alimento puede también tener interés en su estado sanitario y en su papel como reservorio de agentes patógenos. Las formas de destrucción de los residuos procedentes del ganado mediante su consumo por las aves carroñeras, pueden suponer un factor de riesgo para su salud, por la posibilidad de exposición a agentes infecciosos y residuos químicos nocivos (Margalida *et al.*, 2014) especialmente cuando estos restos se disponen para el consumo de las aves sin ningún control toxicológico o de patógenos previo, o cuando se acumulan grandes cantidades de sus restos en descomposición.

Cada especie, o grupo de especies, de ganado presenta un patrón de patógenos distinguible, especialmente en el caso de ganado mantenido en condiciones de explotación intensiva o extensiva. En general, los animales criados mediante sistemas extensivos, presentan un menor número de patógenos específicos, principalmente patógenos ambientales. Al contrario que en los sistemas extensivos, el ganado mantenido en condiciones intensivas, presenta patógenos específicos que con frecuencia producen brotes epidémicos que cursan con morbilidad y mortalidad alta (Mohiuddin, 2007). La gran mayoría de bacterias saprofitas y patógenas que se encuentran en los muladares pueden ser patógenas en las aves carroñeras, y las rapaces que crían en las cercanías de explotaciones ganaderas tienen muchas más posibilidades de sufrir infecciones asociadas al ganado colindante, por el aprovechamiento de restos cárnicos procedentes de la ganadería (Oaks *et al.*, 2004).

En la Comunidad Valenciana (CV), concretamente en la provincia de Castellón, donde se encuentra la población de buitre leonado objeto de este estudio, desde «la crisis de las vacas locas», la alimentación aportada a los muladares, es exclusivamente, cadáveres de porcino procedentes de explotaciones de sistema intensivo de la zona. En esta área geográfica, los buitres leonados y el ganado extensivo comparten espacios donde los unos campean y los otros pastan, zonas en las que, si muere un animal, puede ser consumido por los buitres si no es rápidamente retirado, incluso se han descrito interacciones en vivo con animales moribundos o muy debilitados como ocurre en el caso de partos distócicos, en los que además existe la presencia de sangre y líquidos orgánicos.

En este orden de cosas, *Campylobacter* spp. y *Salmonella* spp., constituyen dos agentes patógenos zoonóticos de gran difusión a nivel mundial, que también pueden producir enfermedad en las especies domésticas de abasto, añadiendo al riesgo sanitario un coste económico elevado. Por ello, resulta de interés estudiar la presencia de estos dos microorganismos en poblaciones de aves necrófagas silvestres, que se alimentan en gran parte de cadáveres de ganado explotado mediante sistemas intensivos. Por otra parte, y a pesar de que las especies de micoplasmas aviares no han sido asociadas con enfermedad en la especie humana, la trascendencia económica de su presentación, el carácter emergente de algunas

de ellas en la avicultura y la participación de algunas especies silvestres en la epidemiología de algunas infecciones, como es el caso de *Mycoplasma gallisepticum*, motiva el interés de evaluar la presencia de estos microorganismos en las poblaciones estudiadas.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1. Características generales del buitre leonado (*Gyps fulvus*).

El buitre leonado (*Gyps fulvus*), descrito por Hablizl en 1783, es una especie de ave de la familia Accipitridae (Bernis *et al.*, 1994). Es una de las mayores rapaces que puede encontrarse en la península ibérica, con un peso, entre 6 y 11 Kg, una altura de 95 a 110 cm y una envergadura entre 2,4 y 2,8 m. (Willis, 1994). Puede alcanzar en libertad una longevidad de al menos 35 años (Chantepie *et al.*, 2016).

Los ejemplares adultos son de color pardo grisáceo, las plumas dorsales, escapulares y cobertoras superiores de la cola y de las alas son de color pardo claro, que contrastan con las plumas remeras oscuras, mientras que las ventrales son pardas y pueden aparecer algo listadas de tonos más claros. Las plumas primarias de las alas y las plumas de la cola son de color negro, las secundarias y terciarias de color pardo, con la punta de las terciarias de color gris. Las patas son de color gris pardo, verdoso o azulado con las uñas negras. No existe dimorfismo sexual, siendo ambos sexos similares en coloración. Llama la atención su largo cuello desnudo de plumas y cubierto, únicamente, con un corto plumón de color blanco crema. En la parte posterior de su base tiene dos calvas que descubren una piel violácea y otras dos en el pecho que descubre voluntariamente y que tienen diferente color según su estado anímico, con colores intensos, desde el rojo al azul y al blanco. Los juveniles, por su parte, son de color marrón rojizo, más oscuro que en los adultos, y poseen un plumaje compuesto por plumas lanceoladas con finas estrías claras, que son renovadas progresivamente por otras de perfil redondeado, por debajo son algo más rojizos, con alguna raya blanca. El plumón de la cabeza y el cuello de los individuos jóvenes es más rosáceo que el de los adultos (Calleja *et al.*, 2008; Asturnatura.com, 2009).

Su cabeza presenta un pico robusto, y el cuello con una gola de plumas, está cubierto de un fino plumón, adaptado para explorar el interior de los cadáveres. Es precisamente en esta zona anatómica donde se pueden apreciar con mayor facilidad las diferentes edades de las aves. Así, los buitres adultos tienen el pico de color hueso, la gola blanca y algodonosa, el plumón de la cabeza claro y el iris de color amarillento o ambarino, mientras que los ejemplares juveniles lucen una gola muy

patente y desflecada, compuesta por largas plumas lanceoladas de color rojizo, y tienen el iris y el pico negros. A medida que crece, pasa por plumajes intermedios, siendo más oscuros en su segundo año, para ir aclarándose paulatinamente hasta acabar adquiriendo el aspecto de un adulto a los 7 u 8 años (Calleja *et al.*, 2008; Asturnatura.com, 2009).

2.1.1. Clasificación taxonómica.

La relación entre los Falconiformes y otras aves aún no están claras, e incluso entre los propios Falconiformes. No hay evidencia en los registros fósiles, de que las diferentes familias tengan un ancestro común. Es posible que los miembros de este orden puedan ser el resultado de una convergencia evolutiva entre grupos (Thiollay, 1994). El orden Accipitriformes incluye la mayoría de las rapaces diurnas. Algunos autores distinguen este orden, del de los Falconiformes, mientras que otros los consideran uno solo. En la clasificación de Clements, existe el orden Accipitriformes con 4 familias de rapaces (Cathartidae, Pandionidae, Accipitridae y Sagittaridae) y un orden Falconiformes, con una única familia (Clements *et al.*, 2010).

En el Congreso Ornitológico Internacional celebrado en Campos do Jordão, Brasil en 2011, también separó los Falconidae en su propio Orden (Falconiformes), agrupando el resto de familias (Cathartidae, Pandionidae, Accipitridae y Sagittaridae) en el orden Accipitriformes, dejando de esta manera las rapaces diurnas separadas en dos órdenes (Gill y Donsker, 2016).

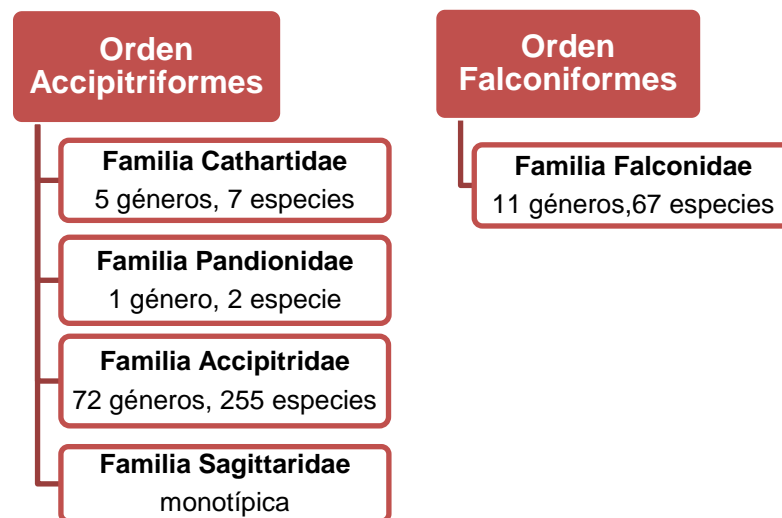


Figura 1. Clasificación taxonómica de las rapaces, del COI de Campos do Jordão, Brasil 2011. (Gill y Donsker, 2016)

Siguiendo este último criterio, los Accipitriformes se clasificarían en cuatro familias, 72 géneros y 255 especies (Figura 1).

Quedando la clasificación del *Gyps fulvus* (Figura 2):

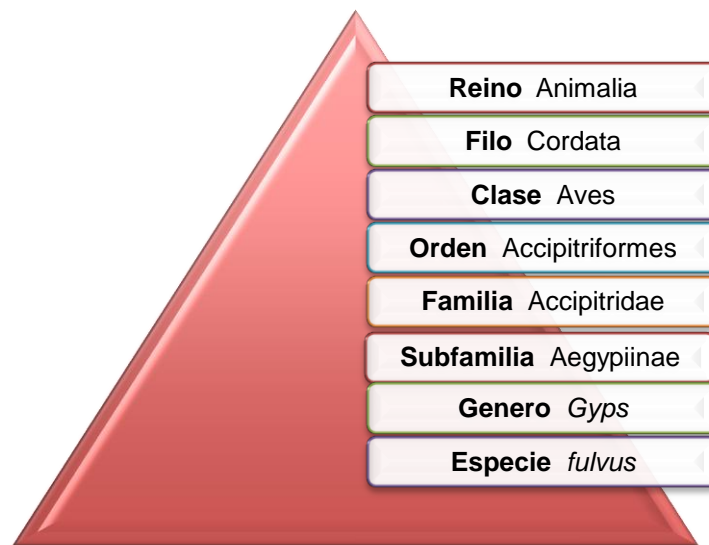


Figura 2. Clasificación taxonómica del buitre leonado.

Se conocen dos subespecies de buitre leonado, *Gyps fulvus fulvus* y *Gyps fulvus fulvescens* que se encuentran en aéreas geográficas diferentes.

2.1.2. Distribución geográfica.

Se trata de una especie de distribución bastante amplia, que ocupa el suroeste y sureste de Europa, el noroeste y sur de África, los Balcanes, Turquía, Arabia, Irán, Afganistán, Pakistán y norte de la India.

Se han descrito dos diferentes subespecies, citadas anteriormente, que ocupan territorios diferentes:

- *Gyps fulvus fulvus* - del noroeste de África y la península Ibérica hasta los Balcanes, Turquía, Oriente Medio, Arabia e Irán.

- *Gyps fulvus fulvescens* - Afganistán, Pakistán y norte de la India hasta Assam. (Willis, 1994).

2.1.2.1. Distribución y censo en Europa.

Junto con el buitre negro, el quebrantahuesos y el alimoche (en verano), es una de las pocas especies de buitres que pueden verse en Europa (Camiña y López, 2009) pues se le puede encontrar en España, Portugal, donde la poblaciones son reducidas y se encuentran en gargantas de los ríos Duero, Tajo y Guadiana (De Juana y Garcia, 2015), zonas aisladas de Francia (donde ha sido reintroducido), buena parte de los Balcanes y Crimea. En Italia, existe una colonia reproductora en Cerdeña. Todas las poblaciones italianas, a excepción de la de Cerdeña, se han extinguido entre los siglos XIX y XX. Los proyectos de reintroducción han llevado a la especie a ocupar parte del área de distribución original, con nuevas poblaciones en Friuli-Venecia Julia, Abruzzo, Lazio y Sicilia. Existen parejas nidificantes después de las últimas reintroducciones en las estribaciones orientales de los Alpes y los Apeninos centrales (Brichetti y Fracasso, 2003).

Mientras la población de buitre leonado en el oeste de Europa (España, Portugal y Francia) ha aumentado mucho durante las últimas tres décadas, el resto de sus poblaciones deben ser consideradas como en peligro, habiéndose extinguido en muchas zonas de su área de distribución (Slotta-Bachmayr *et al.*, 2004) . Se considera que sólo el 10% de la población mundial de buitre leonado se encuentra fuera de la Península Ibérica (Del Moral y Marti, 2001). La población europea de esta especie se estima en 19 000-21 000 parejas reproductoras, con importantes incrementos hasta 1990 y cierta estabilidad posterior (aunque se estimó que podrían existir bastantes más, hasta unas 22 500 parejas), cifras a las que habría que añadir una importantísima población flotante de adultos no reproductores e inmaduros (Calleja *et al.*, 2008).

2.1.2.2. Distribución y censo en España.

En España existe la población de buitre leonado más importante de Europa (Hamemeijer y Blair, 1997; Del Moral y Marti, 2001; Camiña, 2004). El contingente español supone más del 80% de las aves europeas, con 17 337-18 070 parejas

reproductoras censadas en 1999 (Calleja *et al.*, 2008). El censo de buitre leonado en España más actual es el realizado por la Sociedad Española de Ornitología (SEO) en el año 2008 (del Moral, 2009). Se estimó una población de 24 609 parejas. Esta cifra es la suma del número mínimo de las parejas identificadas en cada provincia y comunidad autónoma. En función de las características observadas en las distintas buitreras, se estimó un número de parejas posibles, que llevaría el censo a 25 541 parejas. Aplicando la relación calculada en anteriores ocasiones para obtener el número de individuos de la población (3,1-3,3 individuos por pareja), el número de ejemplares de buitre leonado en España en 2008 sería de 76 288-79 177. Se contabilizaron 1 560 colonias y 225 parejas aisladas.

Por Comunidades Autónomas (Tabla 1), las más pobladas son Castilla y León con el 24% de la población y Aragón con el 21%. En un segundo orden de importancia se encuentran Andalucía, Navarra y Castilla-La Mancha, con cerca del 11% respectivamente. Estas 5 comunidades reúnen el 78% de la población de buitre leonado de España.

Tabla 1. Tamaño de la población del buitre leonado en España por comunidad autónoma. Se detalla el tamaño de población según su importancia y el porcentaje respecto al total (Del Moral, 2009).

COMUNIDAD AUTONOMA	Nº COLONIAS	Nº PAREJAS AISLADAS	Nº MÍNIMO PAREJAS	Nº MÁXIMO PAREJAS	%
Castilla y León	305	30	5 965	6 062	24
Aragón	281	25	5 174	5 174	21
Andalucía	202	28	2 978	3 027	12
Navarra	80	4	2 783	2 783	11
Castilla La Mancha	150	21	2 410	2 501	10
Extremadura	148	37	1 560	1 943	6
Cataluña	124	35	939	1 115	4
País Vasco	59	10	805	805	3
La Rioja	81	7	639	707	3
Cantabria	45	7	443	467	2
Madrid	20	4	454	461	2
Comunidad Valenciana	36	10	253	255	1
Asturias	26	7	151	176	1
Murcia	3	0	55	55	0
TOTAL	1 560	225	24 609	25 541	100

Según este censo, el cuadrante noreste de la Península, el cuadrado formado por Cantabria, Gerona, Castellón y Segovia es la zona con mayor población de buitre leonado en España, acumulando el 76% de la población y 1 030 colonias de las 1 560 detectadas. Este área ha sido tradicionalmente, la más importante para la especie (del Moral, 2009).

En el suroeste peninsular, el triángulo formado por Salamanca, Murcia y Cádiz, también es una zona destacable en cuanto a la población de buitre se refiere, incluyendo el 23% de la población. El buitre leonado se extiende ligeramente fuera de las áreas descritas hacia la cordillera cantábrica y uniendo las dos regiones detalladas a través del Sistema Central.

Existen 38 colonias muy grandes (más de 90 parejas) que acumulan el 24% de la población. Destaca Navarra por tener 10 de estas grandes colonias, también Burgos, donde se incluyen 7 colonias de este tipo y Cuenca con 4; en el resto de provincias con este tipo de colonias no acumulan más de tres (Cádiz, Guadalajara, Huesca y Teruel).

Los datos obtenidos en 2008 evidenciaban que no había parejas de buitres leonados reproduciéndose en las Islas Baleares, Canarias y Galicia. En Galicia, en la provincia de Ourense, ya se observaba un aumento en el número de individuos en determinados dormideros que podrían originar los primeros intentos de cría en las siguientes temporadas (del Moral, 2009). En Baleares, en octubre de ese mismo año, se establece en Mallorca (Garriga, 2009) y se reproduce por primera vez en 2012 (Muntaner, 2012).

En cuanto a los parámetros reproductores, en este censo de 2008, se obtuvo un éxito reproductor de 0,67, según el seguimiento realizado en 12 166 parejas, entendiendo este parámetro como el cociente entre el número de pollos volados y el número de nidos ocupados por parejas reproductoras (se detectó en algún momento inicio de incubación). Otro parámetro estudiado es la productividad, en la que se tienen en cuenta las parejas que ocupan un nido, incuben o no. En el censo realizado por SEO en 2008, este parámetro fue del 0.62. Estos parámetros varían notablemente entre unas provincias y otras, registrándose los máximos valores de productividad en León, Palencia y Murcia (0,75/0,80), donde las poblaciones son

pequeñas. Igualmente se registran los máximos valores de éxito reproductor (0,80/0,90) muy por encima de la media, en las provincias de pequeña población (Murcia, Toledo, Ciudad Real y Albacete). Los valores nacionales son muy inferiores a los de décadas anteriores lo que podría influir en la evolución de la población.

La evolución del tamaño de población en la década anterior a este censo, es claramente positiva, teniendo en cuenta las parejas detectadas en cada temporada, sin aplicar ningún tipo de corrección para la estima final. Se han detectado 7 272 parejas más que en el censo anterior, esto supone un crecimiento de un 42% en los nueve años anteriores (1999-2008), crecimiento porcentual considerablemente inferior al registrado en las décadas anteriores, lo que puede considerarse normal teniendo en cuenta la alta cifra de parejas censadas (Figura 3).

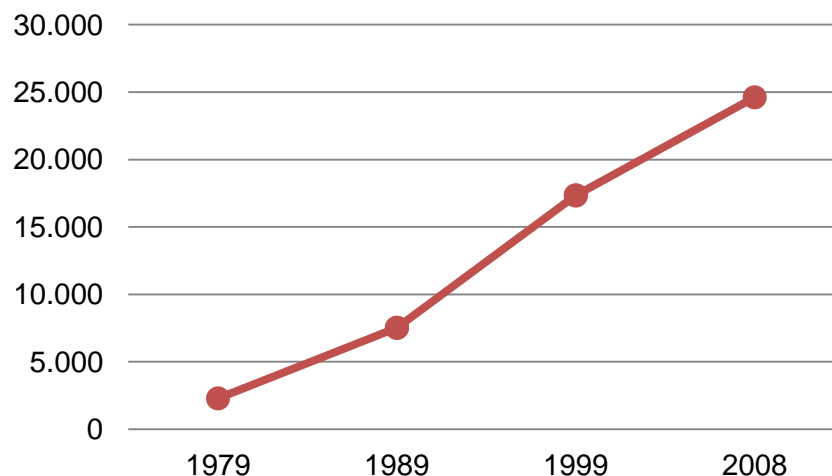


Figura 3. Evolución de la población de buitre leonado en España. Número mínimo de parejas detectadas en cada año (del Moral, 2009).

Además del crecimiento numérico, también se ha comprobado un crecimiento en la superficie ocupada. Se confirma la cría en Valladolid, en Gerona, en Albacete y en Alicante. La expansión en algunas zonas donde era escaso o donde formaba límite del área de distribución también se ha expandido, ampliando dicho límite de distribución, como ha sucedido en Cantabria hacia el oeste, en Barcelona hacia el este y en Cuenca, Valencia y Murcia hacia el sureste. No solo aumenta el número de parejas en los lugares de nidificación ya conocidos y se observa algo de expansión en el área perimetral de ocupación como se comentaba, sino que también aumenta su área de distribución dentro de los límites conocidos al aumentar mucho el número de colonias.

El incremento fue generalizado, aunque también se dieron casos de pérdidas de colonias y de evolución negativa en algunos emplazamientos, especialmente en los cinco años anteriores al censo, cuando entra en vigor la normativa que impide abandonar animales muertos en el campo y el cierre de los muladares, por la crisis de las vacas locas. Sin embargo, hay que destacar que en esos últimos años (2004-2009) también está bien documentado el crecimiento en provincias o comunidades enteras (Salamanca y Madrid o Andalucía y Murcia, por ejemplo), por lo que quizá se está produciendo una redistribución de la población en torno a los puntos de alimentación más adecuados, más que a un declive generalizado (del Moral, 2009).

2.1.2.3. Distribución y censo en la CV.

El buitre leonado, que llegó casi a desaparecer en la CV (quedando un mínimo de 3 parejas recluidas en el norte de Castellón en los años 70), cría hoy en las tres provincias valencianas, alcanzando una cifra total de 559 parejas en 2015. La evolución de la población de la especie desde los años 90 del siglo XX, va en constante aumento en la CV (Figura 4), por provincias, la población de Castellón parece estabilizada, la de Valencia en aumento y la de Alicante disminuye en el último censo (SVS ,2015^a).

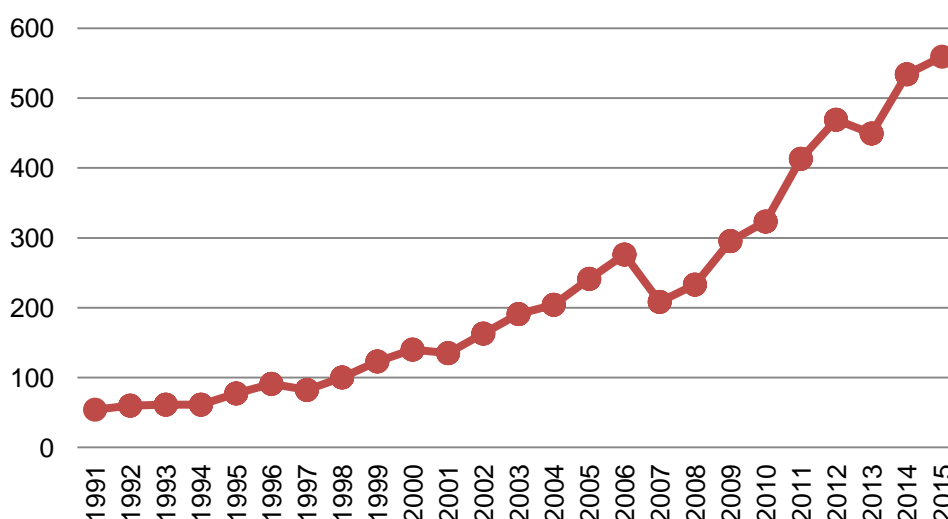


Figura 4. Población reproductora (parejas) de buitre leonado en la CV (SVS, 2015a).

En la provincia de Castellón, la evolución del censo (Figura 5), muestra un aumento sostenido desde 1991, interrumpido por un importante descenso en 2007 a causa

del cierre de muladares en Teruel y la entrada en funcionamiento de los parques eólicos, lo que hizo que los buitres cruzaran los parques eólicos buscando alimento en un vertedero cercano, y se produjeran gran cantidad de muertes por colisión con los aerogeneradores. El cierre del vertedero y la instalación de dos muladares situados estratégicamente, provocaron un cambio de las rutas de los buitres en busca de alimento, contribuyendo a una recuperación posterior hasta alcanzar un máximo en 2014 (534 parejas) y una ligera bajada en 2015 (499 parejas) (SVS, 2015a).

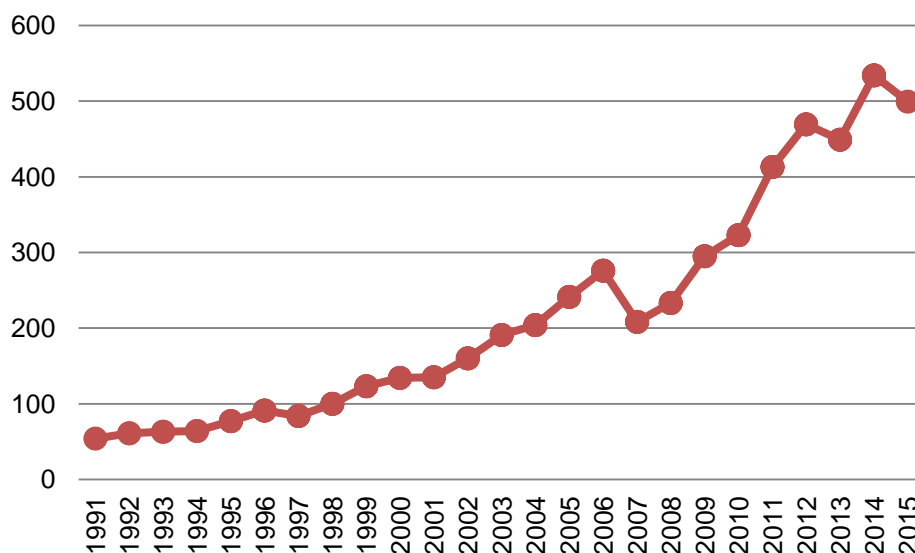


Figura 5. Población reproductora (parejas) de buitre leonado en Castellón (SVS, 2015a).

Existen 4 subpoblaciones en la provincia de Castellón donde anidan el 83% de las parejas de la CV (499 de 559), situadas en las comarcas de la *Tinença*, *Els Ports*, *Montlleó-Penyagolosa* y *Millars-Palancia*. La evolución del número de parejas de las 4 poblaciones se muestra en el siguiente cuadro (Tabla 2).

Tabla 2. Evolución del nº de parejas de la población de Castellón (SVS, 2015a).

POBLACIÓN	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
La Tinença	63	74	88	92	110	139	143	165	155
Els Ports	43	39	52	52	61	57	63	77	70
Montlleó-Penyagolosa	35	25	47	57	65	75	72	91	65
Millars Palancia	67	95	110	122	177	198	171	201	209
Total	208	233	297	323	413	469	449	534	499

En 2015, todas las subpoblaciones disminuyen, excepto la situada más al Sur, y se produce un ligero descenso de la productividad en todas, salvo en el núcleo *Montlleó-Penyagolosa*, lo que sugiere que la población se va saturando. El buitre leonado se extinguió como nidificante en la provincia de Valencia hace ya casi 50 años. La primera reproducción en Valencia se comprobó en 2011, con una pareja en Tuejar, desde entonces no ha dejado de aumentar en La Serranía hasta alcanzar las 34 parejas en 2015, en 4 puntos diferentes, con una productividad de 0,68 pollos/pareja. A esta zona se suma una pequeña colonia (3 parejas) en el extremo sur de la provincia, en el entorno de la sierra Mariola (Bocairant) (Figura 6).

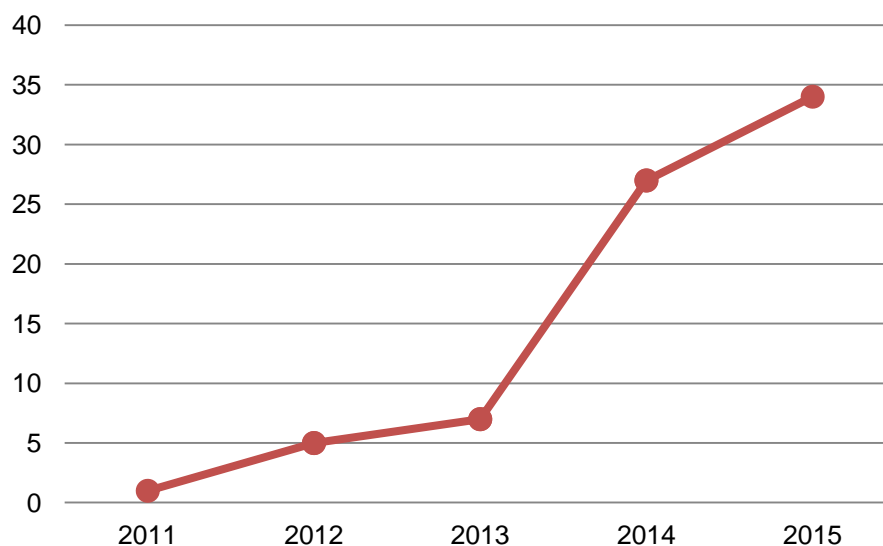


Figura 6. Población reproductora (parejas) de buitre leonado en Valencia (SVS, 2015a).

En la provincia de Alicante, a resultas de un programa de reintroducción iniciado por la asociación FAPAS (Fondo para la protección de los Animales Salvajes)-Alcoi en el año 2000, el buitre leonado volvió a nidificar en la provincia en 2004. Desde entonces la especie ha incrementado su población y se ha reproducido en distintos puntos próximos al municipio de Alcoi, e incluso expandiéndose a la provincia de Valencia (Bocairant). En 2015, la especie ha nidificado en 4 puntos distintos de Alicante, sumando un total de 23 parejas, con un moderado éxito reproductor (0,61).

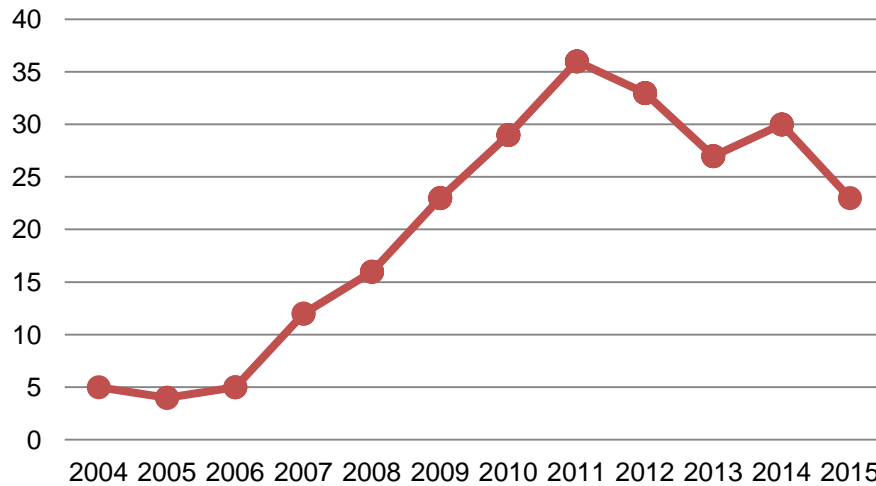


Figura 7. Población reproductora (parejas) de buitre leonado en Alicante (SVS, 2015a).

La evolución de los últimos años de la población de buitres de Alicante, al contrario de lo que ocurre con la del norte de la CV, en la provincia de Castellón, es negativa (Figura 7), tendencia marcada por la colonia principal localizada en el paraje del *Barranc del Cint* (Alcoi) que está disminuyendo desde 2011 (32 parejas) hasta la actualidad (13 parejas en 2015). Entre las razones de la disminución de esta colonia se apuntan las molestias en la zona de cría y la escasa disponibilidad de carroñas en la zona (SVS, 2015a). Su alimentación se suplementa en un muladar, con restos cárnicos y de ganado.

2.1.3. Hábitos alimentarios del buitre leonado en España.

Exclusivamente, o casi exclusivamente, carroñero, se alimenta principalmente de músculos y vísceras de mamíferos medianos y grandes, especialmente de ungulados de especies silvestres (cabras montes, ciervos, etc.) que han ido sustituyendo en mayor o menor medida, por las especies domésticas (ovejas, cabras, vacas, caballos), de las que a menudo se han vuelto totalmente dependientes; a veces se alimenta de otros mamíferos (carnívoros, conejos y liebres, etc.) (Willis, 1994). A partir del año 2000, la legislación de la Unión Europea (UE) limitó progresivamente el abandono de animales muertos. Como consecuencia, el buitre leonado amplió su nicho trófico, consumiendo un número significativo de conejos (*Oryctolagus cuniculus*) y basura (Donázar *et al.*, 2010). Solo de modo excepcional es capaz de comer animales muy debilitados pero todavía vivos

(Cardenal *et al.*, 1995; Donazar, 1997) incluso casos de canibalismo de forma todavía más excepcional (Martínez De Lecea *et al.*, 2011).

Suelen cooperar en la búsqueda de alimento, dispersándose hasta 10 km de la colonia, explorando meticulosamente amplias áreas; cuando un individuo localiza carroña, avisa al resto, que se congrega alrededor de la misma, hasta que uno de los ejemplares empieza a comer. También pueden verse en vertederos, donde todavía existen (Willis, 1994). Salvador (2016), recoge varias hipótesis sobre la transferencia de información durante la búsqueda de carroñas en el buitre leonado. Según una hipótesis «no social», los buitres solamente usan información individual durante la búsqueda. Según otra hipótesis, llamada «refuerzo social», los buitres forman largas cadenas de buitres que siguen a otros que vuelan hacia las carroñas (Donazar, 1993). Por otro lado, una hipótesis local sugiere que los buitres son atraídos por aquellos buitres que hacen vuelos de cicleo sin ganar altura y descienden verticalmente hacia una carroña. Un estudio realizado en el noreste de la Península Ibérica ha comprobado que el comportamiento y abundancia de buitre leonados y carroñas en un área de 10 000 km² se ajusta a la hipótesis local (Cortés *et al.*, 2014).

El número de individuos que se reúnen en la carroña puede ser de más de 300 (Donazar, 1993). Puede observarse congregaciones cercanas al millar de aves, e incluso superiores (Acha *et al.*, 1998). Se ha sugerido que el hambre regula la jerarquía de acceso a la carroña que se forma entre los individuos que van llegando (König, 1974; Terrasse y Terrasse, 1974). Salvador A. (2016) indica que hay observaciones realizadas sobre buitres anillados de edad conocida que muestran que es la edad la que determina el acceso a las carroñas. El número de buitres presentes junto a la carroña se incrementa rápidamente antes de disminuir lentamente y se correlaciona con la cantidad de alimento disponible. El tamaño de grupo observado siempre es menor que el tamaño potencial que saciaría a todos los individuos. Los adultos viejos llegan antes y se marchan antes que los individuos más jóvenes y probablemente se benefician de un alimento de mayor calidad. Algunos viejos adultos son los primeros en comer. Debido a la impredecible del acceso a las carroñas y de los costes de su localización, los buitres prefieren permanecer y competir antes que buscar otra carroña (Bosè *et al.*, 2012).

Siempre se observan en las carroñas más adultos viejos que adultos jóvenes e inmaduros. En otoño se incrementa el número de juveniles en las carroñas, alcanzando el 11% (Bosè *et al.*, 2012). Los buitres juveniles prefieren alimentarse en puntos de alimentación suplementaria situados lejos de las colonias de reproducción y en los que se depositan carroñas más irregularmente y en menor cantidad. En estos sitios los juveniles llegan antes que los adultos y en mayor proporción (Duriez *et al.*, 2012).

Las bajas necesidades tróficas de los buitres permiten reducir el metabolismo y prolongar el ayuno, lo que es ventajoso para localizar un alimento espacial y temporalmente impredecible como las carroñas (Donazar, 1993). Los buitres están más activos cuando están hambrientos. Vuelan distancias mayores y se mueven más lejos de los dormideros que cuando están saciados. Sin embargo, cambian su estrategia en función del número de días sin obtener alimento para evitar el riesgo de colapso fisiológico por hambre. Los primeros días sin alimento incrementan las distancias recorridas, los desplazamientos máximos y la altitud del vuelo, mientras que los siguientes días los disminuyen. Hay un cambio de estrategia de maximizar la obtención de alimento durante los primeros días a minimizar el gasto energético los días siguientes (Spiegel *et al.*, 2013).

En la CV Desde la prohibición del abandono de cadáveres y la obligatoriedad de su destrucción, por la aparición de la encefalopatía espongiforme bovina (EEB) en Europa a mediados de la década de 1990, la disponibilidad de alimento para los buitres se vio mermada, alterándose la relación cordial clásica entre ganaderos y aves carroñeras (SVS, 2016). La suma de eliminación de fuentes de alimentación (cierre de los muladares de Teruel) y mortalidad generada por los parques eólicos (agravada por localizarse algunos de estos en la ruta a un vertedero de residuos sólidos urbanos donde los buitres encontraban el alimento que les faltaba), produjo en 2007 un descenso de la población reproductora en la provincia de Castellón. Esta situación se resolvió con la paralización de los aerogeneradores más peligrosos, la clausura del vertedero y la puesta en marcha de nuevos comederos tanto en Teruel como en Castellón (SVS, 2016).

Según establece el Real Decreto 1632/2011, de 14 de noviembre, por el que se regula la alimentación de determinadas especies de fauna silvestre con subproductos animales no destinados a consumo humano (BOE, 2011b), existen varias posibilidades de aportes alimenticios a especies necrófagas; alimentación en comederos o muladares y alimentación fuera de los muladares, bien en explotaciones extensivas incluidas en zonas declaradas de protección sin la recogida previa de los cadáveres, y en acotados con subproductos cinegéticos de categoría 2.

2.1.4. Situación legal y grado de protección.

Considerada como Preocupación menor para la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) organización que tiene por misión influir, estimular y apoyar a las sociedades de todo el planeta, con objeto de mantener la integridad de la naturaleza y asegurar el uso equitativo y ecológicamente sostenible de los recursos naturales. Su objetivo fundamental es la preservación del patrimonio natural y la diversidad biológica. La UICN es la organización medioambiental más antigua y más grande del mundo, con más de 1200 miembros gubernamentales y no gubernamentales, además de unos 11 000 expertos voluntarios en cerca de 160 países (UICN, 2016).

En España se considera una especie fuera de peligro, se considera una especie relativamente segura porque se han tomado medidas efectivas de conservación o porque se han eliminado los factores que amenazaban su supervivencia (Blanco y Gonzalez, 1992). No incluido en el libro rojo de las aves de España, aunque fue catalogado como especie «De interés especial» el 5 de abril de 1990, por el Real Decreto 439/1990 (BOE, 1990), es decir, que merece una atención particular en función de su valor científico, ecológico, cultural o por su singularidad y exige la redacción de un Plan de Manejo. Por Resolución de la Dirección General de Planificación y Gestión del Medio de 5 de abril de 2001, se aprobó un Plan de Acción para la conservación de las aves necrófagas en la CV, posteriormente renovado por Resolución de 13 de diciembre de 2004 de la Dirección General de Gestión del Medio Natural, que contemplaba, entre otras, el seguimiento de las poblaciones, la atención a las reclamaciones sobre ataques de buitres al ganado y el funcionamiento

de comederos (SVS, 2016). A partir de febrero de 2011 está incluido en el LESRPE (Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial) Real Decreto 139/2011 (BOE, 2011^a). También está incluido en los anexos I y II de la Directiva 79/409/CEE del Consejo, relativa a la conservación de las aves silvestres (CEE, 1979), Anexo II del Convenio de Berna relativo a la Conservación de la Vida Silvestre y del Medio Natural en Europa, ratificado por España en 1986 (BOE, 1986) Anexo II del Convenio de Bonn sobre la conservación de las especies migratorias de animales silvestres, ratificado por España en 1985 (BOE, 1985). En la CV existe el Catalogo Valenciano de Especies Amenazadas, pero no encontramos en él al buitre leonado (DOGV, 2004).

Las amenazas de sus poblaciones son los venenos, la falta de alimento, los cambios en el uso del suelo con disminución del número de ungulados domésticos y silvestres, las electrocuciones, las molestias, la muerte por disparos, el robo de huevos (Slotta-Bachmayr *et al*, 2004) y el choque contra las aspas de aerogeneradores de parques eólicos (Lekuona y Ursúa, 2009). Como ya se mencionó con anterioridad, en la CV, la suma de eliminación de fuentes de alimentación (cierre de los muladares de Teruel) y mortalidad generada por los parques eólicos motivó el descenso poblacional en 2007 (SVS, 2016). El uso del veneno, indicado por muchos autores como una de las principales amenazas para la especie (Slotta-Bachmayr *et al.*, 2004; Berny *et al.*, 2015) para otros hace relativamente poca mella porque su dieta se basa en grandes cadáveres que raramente contienen tóxicos mortíferos (Donazar, 2009). En la CV no parece ser una de las grandes amenazas de la especie, pues desde 2006 en el que hubo un episodio de envenenamiento en el que murieron 11 buitres, no se ha detectado ningún buitre afectado por veneno (SENB, 2012; SVS, 2013; SVS, 2014; SVS, 2015b).

La aparición de la encefalopatía espongiiforme bovina dio lugar a la publicación del Reglamento europeo 1774/2002 (CE, 2002) por el que los cadáveres de rumiantes debían ser llevados a plantas procesadoras para su transformación bajo ciertas condiciones de presión y temperatura y garantizar así la no transmisión de esta enfermedad infecciosa. Como resultado inmediato, se redujo drásticamente la disponibilidad de alimento para los buitres (Camiña y Montelío, 2006), ya que

tradicionalmente los cadáveres se dejaban a disposición de los buitres para su eliminación. En la CV, la prohibición del depósito de restos animales en el campo no llegó a tener influencia sobre las poblaciones de buitres por las rápidas medidas adoptadas por las administraciones implicadas para permitir el mantenimiento de muladares y comederos en condiciones debidamente controladas (Mateache, 2003).

2.2. Presencia de agentes infecciosos y parasitarios en el buitre leonado.

Es ampliamente aceptado que los buitres muestran una alta resistencia a agentes patógenos letales para otros animales (Kalmbach, 1939) probablemente gracias a la protección proporcionada por la microbiota (Winsor *et al.*, 1981). No obstante, la alimentación de estos animales a base de cadáveres o restos de ganado hace posible que puedan adquirir patógenos oportunistas o específicos de las distintas especies ganaderas de las que se alimentan, especialmente cuando se utilizan especies necrófagas como método de eliminación de subproductos de ganadería. Las condiciones, muchas veces insalubres de los comederos en los que se aporta el alimento a los buitres, donde se produce la presencia de gran cantidad de individuos sobre restos cárnicos en descomposición, produce la proliferación de patógenos y las aves que se allí se alimentan pueden actuar como difusores de patógenos bacterianos asociados con esas fuentes de alimentos (Houston y Cooper, 1975; Winsor *et al.*, 1981; Hatch, 1996). A continuación, describimos la información existente en la bibliografía en referencia a la presencia de agentes parasitarios e infecciosos en esta especie:

2.2.1. Parásitos.

Se ha descrito la presencia tanto de endoparásitos como de ectoparásitos en el buitre leonado, aunque existen pocos estudios al respecto:

Entre los endoparásitos del grupo Apicomplexa, se ha descrito *Babesia moshkovskii* (Merino *et al.*, 2002). Blanco *et al.*, (1998) no encontraron parásitos sanguíneos en una muestra de 82 buitres leonados examinados en España, las muestras fueron tomadas en animales de distintos orígenes, en momentos diferentes y con gran disparidad de edades. *Toxoplasma gondii*, fue hallada en el 17,7% de una muestra

de 175 buitres leonados ibéricos analizados (Cabezón *et al.*, 2011) y en el tejido cerebral de 1 individuo (Darwich *et al.*, 2012).

En cuanto a los ectoparásitos, en el grupo de insectos de los Mallophaga Amblycera, piojos masticadores que parasitan aves y mamíferos, *Nosopon casteli*, fue hallado en dos ejemplares de *Gyps fulvus*, uno de Matalascañas, en la provincia de Huelva, en diciembre de 1986 y el otro de Matas-gordas, también en la provincia de Huelva, en marzo de 1987 (Pérez y Palma, 2000). Martín, en 2006, recoge los insectos de este grupo que han sido citados en aves de la Comunidad de Madrid, y en concreto en el buitre leonado han sido citados, *Colpocephalum gypsi*, *Colpocephalum turbinatum*, *Cuculiphilus gypsi*, y *Laemobothrion vulturis*. También en el buitre leonado, se citaron piojos del grupo Phthiraptera Ischnocera, concretamente *Falcolipeurus quadripustulatus* y *Aegypocercus trigonoceps*. Entre los ectoparásitos, también se ha observado la presencia de ácaros en buitres leonados como *Argas gilcolladoi*, especie representativa de un grupo ampliamente distribuido que parasitan buitres leonados (Estrada-Peña *et al.*, 1987).

2.2.2. Agentes infecciosos: virus.

Se ha descrito la presencia de virus en aves necrófagas como el virus de la enfermedad de *Newcastle*, que se aisló en un hisopo cloacal, pulmones e hígado de una hembra adulta de quebrantahuesos (*Gypaetus barbatus*) que murió sin signos clínicos previos en la Universidad de Tel Aviv (Lublin *et al.*, 2001). En Norte América han aparecido ejemplares de Zopilote negro (*Coragyps atratus*), afectados por el virus del *West Nile* (Komar, 2003). En Burkina Faso, de febrero a junio de 2006, de 45 buitres encapuchados (*Necrosyrtes monachus*) localizados muertos o moribundos, 17 resultaron positivos a la prueba rápida para el diagnóstico de la influenza aviar (Ducatez *et al.*, 2007).

En un estudio en cuatrocientos cuarenta y ocho muestras de plasma sanguíneo de aves rapaces silvestres de Berlín y la zona de Brandenburgo, en Alemania oriental, se realizaron pruebas de detección de anticuerpos contra el virus de la enfermedad de *Newcastle* (en sus siglas en inglés NDV), el herpesvirus del halcón (en sus siglas en inglés FHV) y del herpesvirus del búho (en sus siglas en inglés OHV). Se detectaron anticuerpos del NDV en ratonero común (*Buteo buteo*), águila pescadora

(*Pandion haliaetus*) y aguilucho lagunero (*Circus aeruginosus*). Se encontraron anticuerpos contra el FHV en un águila pescadora (*Pandion haliaetus*), anticuerpos contra el OHV en un cárabo (*Strix aluco*) y un ratonero común (*Buteo buteo*) (Schettler *et al.*, 2001).

En España, la infección por herpesvirus está presente en las tres grandes familias de rapaces, Falconidae (Mozos *et al.*, 1994), Acciptridae (Ramis *et al.*, 1994) y nocturnas (Titonidae y Strigidae) (Gomez-Villamandos *et al.*, 1995). Anticuerpos frente a *paramixovirus* se han detectado en 120 de 700 muestras de 31 especies de aves rapaces cautivas y de vida libre (Höfle *et al.*, 2002). La enfermedad de Gumboro, o bursitis infecciosa también ha sido descrita en aves rapaces en España (Oña *et al.*, 2000; Höfle *et al.*, 2001) así como la presencia de virus de la viruela aviar en ejemplares juveniles de águila imperial (Hernández *et al.*, 2001).

2.2.3. Agentes infecciosos: hongos.

Se han encontrado lesiones en la cavidad oral de pollos y adultos producidas por levaduras sobre todo del género *Cándida*, especialmente en la lengua y con menor frecuencia en la faringe, paladar y otras partes de la cavidad oral. Aunque esta levadura y otros hongos pueden ser habitantes normales del tracto alimentario superior de las aves, la presencia de lesiones de estos patógenos oportunistas implica una infección en curso (Lopez-Rull *et al.*, 2015). Las lesiones, por sí mismas no suponen un riesgo para la supervivencia del individuo afectado, pero provocan dolor intenso al tragar el alimento y especialmente el predigerido por los padres, con pH muy ácido, por lo que muchos de los pollos afectados están severamente desnutridos. También se ha descrito la presencia de *Aspergillus fumigatus*, en buitre negro con patologías previas, ya que se trata de un patógeno oportunistas que causa la aspergilosis pulmonar en animales y humanos con los sistemas inmunes comprometidos (Jung *et al.*, 2009)

2.2.4. Agentes infecciosos: bacterias.

Se ha detectado la presencia de especies del género *Mycoplasma* spp. en buitres leonados del sur de España. Así, Poveda *et al.*, (1990) aislaron cuatro cepas de *Mycoplasma* spp. de buitres leonados silvestres, aunque no se identificó la especie.

Coxiella burnetii, fue aislada en el 11% de los buitres leonados estudiados, en el País Vasco, así como en otras especies de animales silvestres, lo que demuestra que esta bacteria circula en la vida silvestre en España, y que estas especies silvestres deben ser tenidas en cuenta en su relación con el ciclo de la fiebre Q en la naturaleza (Astobiza *et al.*, 2011). *Chlamydiaceae* spp. ha sido hallada en buitres leonados silvestres, como en la mayoría de las rapaces, que pueden ser reservorios naturales de este género, especialmente el buitre leonado (*Gyps fulvus*) y el cernícalo común (*Falco tinnunculus*) (Ortega *et al.*, 2012). *Staphylococcus aureus* de tipo ST133 se aisló en muestras tomadas de fosas nasales en 2 buitres de una muestra de 40 individuos de diversas regiones de España (Porrero *et al.*, 2014). Existe también publicada una caracterización de 14 serotipos de *Escherichia coli* obtenidos de 10 buitres leonados, durante un programa de reintroducción en el Sureste de España (Mora *et al.*, 2014).

Vela *et al.*, (2015) en un estudio realizado en 75 buitres leonados de Cataluña y Navarra, comprobaron que existe una gran diversidad bacteriana en la faringe y en la cloaca del buitre leonado, formada por 26 géneros de microorganismos Gram-negativos y 20 géneros Gram-positivos. Los géneros más abundantes hallados en este estudio fueron *Escherichia*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Clostridium* y *Lactococcus*. *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis* fueron las especies más comunes. *Staphylococcus* spp. y *Erysipelothrix* spp. se encontraron en la faringe y *Salmonella* spp. y *Corynebacterium* spp. en la cloaca. Diez muestras de cloaca fueron positivas para *Salmonella* spp. en este estudio, de los cuales cinco cepas fueron *S. entérica* serotipo 4, (5), 12: i: -, en uno fue aislado *S. entérica* serotipo Derby, tres fueron *S. entérica* serotipo 61: k: 1, 5,7 y uno *S. entérica* serotipo Infantis.

Millan *et al.*, (2004) en un estudio sobre *Salmonella* spp. en aves y mamíferos silvestres, identificaron cuatro serotipos de *Salmonella* spp. en rapaces. En ese mismo estudio, identificaron en un buitre leonado *S. Typhmuri*, serotipo muy frecuente en el ganado (Cruchaga *et al.*, 2001). Molina-Lopez *et al.*, (2011) aíslan en 3 buitres leonados, de 9 estudiados en el Centro de Recuperación de Fauna de Torreferrussa, en la provincia de Barcelona, *S. Derby*, *S. Typhimurium* y *S. Schwarzengrund*.

En cuanto a *Campylobacter* spp., Millan *et al.*, (2004) en el estudio mencionado anteriormente, aíslan también, en una muestra cloacal de un buitre *Campylobacter jejuni* y Vela *et al.*, (2015) evalúan la presencia de *Campylobacter* spp. en su estudio también mencionado, sin aislar *Campylobacter* spp. en ninguna de las muestras cloacales.

2.3. Importancia de la presencia de portadores de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. y *Mycoplasma* spp. en especies silvestres.

La campilobacteriosis y la salmonelosis son las dos zoonosis de mayor prevalencia en Estados Unidos (EEUU) (CDC, 2016), en la UE y en otros muchos países del mundo (EFSA, 2016). Estas zoonosis representan un importante problema de salud pública y su control se ha convertido en un reto fundamental en la mayoría de los países (Kapperud *et al.*, 2003; Mermin *et al.*, 2004; De Jong *et al.*, 2005; Nakadai *et al.*, 2005; FAO/OMS, 2009; EFSA, 2016). La campilobacteriosis y la salmonelosis son responsables respectivamente de 229 213 y 94 625 casos de enfermedades en la UE en 2015 (EFSA, 2016).

La existencia de reservorios de *Campylobacter* spp. y *Salmonella* spp. en la fauna silvestre ha sido considerado como un peligro potencial para la salud humana y la sanidad animal. Sin embargo, el número de especies silvestres que actúan como reservorios es desconocido (Molina-Lopez *et al.*, 2011). Especies de *Campylobacter* spp. y *Salmonella* spp. se han aislado a partir de una amplia variedad de aves silvestres, aunque hay una gran variación entre los serotipos (Wilson y MacDonald, 1967; Chuma *et al.*, 2000; Petersen *et al.*, 2001; Broman *et al.*, 2002; Refsum *et al.*, 2002; Waldenström *et al.*, 2002; Reche *et al.*, 2003; Millan *et al.*, 2004; Kocabiyik *et al.*, 2006; Hughes *et al.*, 2008; Botti *et al.*, 2013).

Por otra parte, y aunque no se ha determinado el potencial zoonótico de las especies de *Mycoplasma* aisladas de aves silvestres, estos microorganismos ocasionan pérdidas importantes en la producción de aves de corral criadas en sistemas intensivos, De todas las especies de micoplasma descritas en las aves, existen cuatro reconocidas como patógenos de aves de corral económicamente importantes, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*, *Mycoplasma meleagridis* y *Mycoplasma iowae*, que en ocasiones, han sido relacionadas con la

presencia de reservorios silvestres, en ocasiones, también afectados por dichos microorganismos (Ramírez *et al.*, 2008; Bradbury, 1998).

2.4. La infección por *Campylobacter* spp.

2.4.1. Contexto histórico.

La primera vez que se describió una bacteria del género *Campylobacter* fue en 1886, por Theodor Escherich, que observó una bacteria con forma espiral en heces de neonatos con diarrea y fiebre (Skirrow y Blaser, 1992). McFadyean y Stockman, en 1913, establecieron la participación de una bacteria en abortos del ganado ovino y bovino, que se clasificó como *Vibrio fetus* por su morfología en espiral. Jones, Orcutt y Little, en 1931, aislaron a partir de diarreas de bóvidos, un germen al que denominaron *Vibrio jejuni*. No fue hasta 1963, cuando se consideró por Sebald y Véron, como un nuevo género llamado *Campylobacter* (Sebald y Veron, 1963). Butzler y Skirrow, Bolton y Robertson, y Blaser *et al.*, desarrollaron medios selectivos que permitieron aislar estos microorganismos con relativa facilidad y establecer su participación en diferentes cuadros infecciosos en el hombre (Farace y Viñas, 2007).

2.4.2. Taxonomía y características.

El género contiene 18 especies y seis subespecies clasificadas por comparación de la secuencia del gen 16S del Ácido ribonucleico ribosómico (rRNA). Las especies que se describen con más frecuencia en heces diarreicas son *C. jejuni* (81%), *C. coli* (8,4%), *C. fetus* (0,2%), *C. lari* (0,1%) y *C. upsaliensis* (0.09%). El 10,3%, representaron otras especies de *Campylobacter* pero la gran mayoría de estos casos fueron notificados a nivel nacional como *C. Jejuni/C. cólico /C. Lari* no diferenciado (EFSA, 2016). El género *Campylobacter*, está incluido en la subdivisión épsilon (ϵ) de las Protobacterias, clasificación basada en las características de la secuencia 23S rRNA (Van Damme *et al.*, 2005). Otros miembros de esa subdivisión incluyen los géneros *Arcobacter*, *Helicobacter* y *Wolinella*.

Campylobacter spp. son bacterias alargadas, curvadas o en espiral, Gram-negativas, de 0.2-0.8 μm de ancho por 0.5-5 μm de largo. Son catalasa-positivo y oxidasa-positivo y negativos al test de la ureasa. Células muy móviles gracias a un flagelo en

uno de sus extremos o en ambos. El rango de temperatura para su crecimiento oscila entre 33 y 44°C (Van Putten *et al.*, 2009) con una temperatura óptima de crecimiento de 42°C. Por lo general, *Campylobacter* spp. es una bacteria microaerófila, que puede crecer en medios con bajos niveles de oxígeno (3-15%). *Campylobacter* spp. es sensible a condiciones ambientales severas como la falta de humedad o el estrés osmótico, y generalmente menos resistente a condiciones adversas que otros patógenos transmitidos por los alimentos, como *Salmonella* spp. (Silva *et al.*, 2011). *Campylobacter* spp. es también sensible a medios salinos y a la congelación (Garénaux *et al.*, 2009).

Cuando las condiciones son adversas *Campylobacter* spp. adopta una forma cocoide, perdiendo la capacidad de cultivo con métodos tradicionales (Klančnik *et al.*, 2013). Rosenquist *et al.*, en 2006 describieron estas formas cocoidales, como formas no viables, degenerativas, o formas latentes, no cultivables pero metabólicamente activas (sus siglas en inglés VBNC), forma resistente adopta en condiciones adversas y recuperables, pasando a su forma habitual, en un huésped animal adecuado, cuando las condiciones para su crecimiento y desarrollo son favorables.

2.4.3. Aspectos clínico-epidemiológicos de la campilobacteriosis en la especie humana.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que alrededor del 1% de la población europea se infecta por *Campylobacter* spp. cada año. *Campylobacter* spp. ha sido el patógeno bacteriano intestinal más frecuente en los seres humanos en la UE desde el año 2005. En el año 2015, los datos de campilobacteriosis declarados en la UE fue de 229 213 casos confirmados, lo que supuso un descenso de 7 638 casos con respecto a 2014. La tasa de notificación de la UE fue de 65,5 casos por 100 000 habitantes en 2015, con un descenso del 5,8% en relación con 2014 (69,5 casos por 100 000 habitantes)(EFSA, 2016). La media de casos en los 12 meses de 2015, mostró una tendencia de aumento estadísticamente significativa ($p < 0,05$) durante el período de 8 años 2008-2015. En la mayoría de los Estados Miembros las tasas de notificación aumentaron en 2015, con casi la mitad de la EM notificando aumentos significativos entre 2008 y 2015. A pesar del alto número de casos de

campilobacteriosis humanas, su gravedad en casos de letalidad fue baja (0,03%) (EFSA, 2016).. Este aumento significativo de casos desde 2008 puede tener varias causas, como una mayor concienciación de los médicos y la mejora de los métodos de cultivo y detección en el laboratorio (Friedman, 2000). Hubo una clara variación estacional de los casos confirmados de campilobacteriosis notificados en la UE en el periodo 2008-2015 con fuertes picos en los meses de verano. Se observaron picos pequeños, en enero ^a partir de 2011 (EFSA, 2016). Esto se podría explicar por el cambio de costumbres en esa época del año, proclive a actividades al aire libre, aumentando el contacto con los animales, comiendo barbacoas y bebiendo o ingiriendo accidentalmente aguas no tratadas (Newell *et al.*, 2011). En verano también aumenta considerablemente la población de moscas, consideradas como una fuente de la infección (Jonsson *et al.*, 2012).

La campilobacteriosis es la causa más común de gastroenteritis bacteriana aguda en el mundo industrializado (Patrick *et al.*, 2013; Deogratias *et al.*, 2014; Duarte *et al.*, 2014; Sarkar *et al.*, 2014). La dosis infectiva es generalmente baja, de 500 a 800 bacterias (Conlan *et al.*, 2011) y los síntomas más comunes incluyen gastroenteritis aguda, dolor cólico abdominal, fiebre, vómitos y dolor de cabeza (OMS, 2011). La diarrea se produce poco después de la aparición del dolor abdominal y varía desde leve, no inflamatoria y acuosa a grave y hemorrágica. El periodo de incubación de *Campylobacter* spp. es generalmente de 3 días, oscilando entre 18 horas y 8 días (Horn y Lake, 2013). La evolución de la enfermedad depende principalmente de la virulencia de la cepa infectante. La respuesta de las personas afectadas depende de su estado inmunitario.

La enfermedad intestinal causada por *Campylobacter* spp. rara vez precisa de hospitalización, por lo que la tasa real de incidencia es probable que sea sustancialmente más alta que los casos declarados (Friedman, 2000), en 2014 los casos de hospitalización declarados en la UE aumentaron en un 50%, pero aun así sólo precisaron hospitalización el 25,4% de todos los casos de campilobacteriosis confirmados en 2014 (EFSA, 2015), en 2015 precisaron hospitalización el 27% de los casos notificados (EFSA, 2016). Las infecciones por *Campylobacter* spp. en humanos, rara vez provocan la muerte. El número de muertes notificadas atribuidas a campilobacteriosis aumentó de 25 muertes en 2014 a 59 muertes en 2015,

resultando en un caso de letalidad de la UE del 0,03%. Esto fue similar al porcentaje promedio de resultado fatal observado durante los últimos 5 años (EFSA, 2016). Niños menores de 1 año y jóvenes entre 15 y 25 años adquieren la infección con más frecuencia (Patrick *et al.*, 2013).

La campilobacteriosis es generalmente una enfermedad autolimitante, y la terapia con antimicrobianos no está recomendada en casos sin complicaciones. En casos más graves, antibióticos macrólidos como la eritromicina y fluoroquinolonas como el ciprofloxacino, son los antibióticos usados habitualmente (Mourand *et al.*, 2014). Los pacientes continúan eliminando bacterias en las heces varias semanas, incluso meses, después de la recuperación, aunque la infección haya sido tratada con antibióticos. La mortalidad es baja y generalmente relacionada con pacientes de edad avanzada o que padecen patologías previas (Zilbauer *et al.*, 2008) como el SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirido) (OMS, 2011).

Pueden existir complicaciones posteriores a la infección, tales como el síndrome de Guillain-Barre (GBS), secuela crónica más común (Zautner *et al.*, 2014). Esta síndrome consiste en una desmielinización neuropática (Rajabally *et al.*, 2014) que provoca una parálisis progresiva (Zilbauer *et al.*, 2008). Se estima que una de cada 10 infecciones por *Campylobacter* spp. lleva a GBS, con un 2-3% de muertes (Allos, 1997). El síndrome *Miller Fisher* es una variante no paralítica del GBS, que causa incapacidad de los movimientos oculares, y pupilas no reactivas (Mori *et al.*, 2012). La artritis reactiva, es otra de las posibles complicaciones de las infecciones por *Campylobacter* spp. en 7 de cada 100 casos (Ajene *et al.*, 2013). En raras ocasiones, *C. jejuni* ha sido asociada con hemorragias intestinales (Chamovitz *et al.*, 1983), megacolon tóxico (McKinley *et al.*, 1980), síndrome urémico hemolítico (Shulman y Moel, 1983) y síndrome del intestino irritable (Gradel *et al.*, 2009).

2.4.4. Las aves como fuente de infección de campilobacteriosis.

Existen numerosas fuentes de infección por *Campylobacter* spp., el consumo de carne de cerdo y de vacuno (Denis *et al.*, 2011), de leche cruda (Bianchini *et al.*, 2014), de aguas sin tratar (Khan *et al.*, 2014) o de agua de lluvia (Rechenburg y Kistemann, 2009). Viajar a países extranjeros también ha sido asociado con infecciones por *Campylobacter* spp. (Olson *et al.*, 2008).

Las aves son los hospedadores más frecuentes de *Campylobacter* spp. a causa de su mayor temperatura corporal (Skirrow y Blaser, 2000). El tracto intestinal de los pollos y especialmente el colon y el ciego, pueden albergar un gran número de *Campylobacter* spp. Durante el procesado de los pollos, el tracto intestinal puede romperse o escapar parte de su contenido y transferirse la bacteria al resto de las canales (Rosenquist *et al.*, 2006). *Campylobacter* spp., permanece como una película líquida sobre la piel, lo que proporciona un ambiente favorable para la contaminación (Zbrun *et al.*, 2013). La persistencia y la supervivencia de *Campylobacter* spp. se ven favorecidas por el microambiente de la piel (Chantarapanont *et al.*, 2003). En condiciones de congelación o almacenado a 4°C, *Campylobacter* spp. puede permanecer en las canales (Eideh y Al-Qadiri, 2010). Muchos casos de infección están asociados con la manipulación y el consumo de carne de ave cruda o poco cocinada. Puede existir contaminación entre carne cruda contaminada y alimentos cocinados (Hoelzl *et al.*, 2013). También es frecuente la contaminación desde productos crudos de pollo a utensilios de cocina como tablas de cortar, cuchillos, platos, y especialmente a las manos (Pouillot *et al.*, 2012). El embalaje de la carne de ave es un factor de riesgo en la transmisión de *Campylobacter* spp., de hecho Harrison *et al.*, (2001) demostraron que el 3% de los embalajes externos de productos crudos de pollo estaban contaminados con *Campylobacter* spp. El envasado en atmósfera controlada también puede favorecer el crecimiento del germen, incrementando el riesgo para los consumidores si el pollo contaminado no se almacena y manipula adecuadamente. (Luber *et al.*, 2006)

La vía de transmisión de *Campylobacter* spp. incluye el contacto directo e indirecto con animales infectados, las personas y el medio ambiente (Humphrey y Bygrave, 1988; Kapperud *et al.*, 2003). En este contexto, la excreción de heces de las aves silvestres en el medio ambiente ha sido identificado como un importante reservorio de *Campylobacter* spp. (Waldenström *et al.*, 2010). Por ejemplo, la exposición a las heces contaminadas de aves silvestres en zonas de juego, ha sido reconocida como una potencial fuente ambiental de la campilobacteriosis, especialmente para los niños (French *et al.*, 2009). La materia fecal aviar que se encuentra en los parques infantiles dio positivo para *C. jejuni* en muestras secas y frescas (Whiley *et al.*, 2013). Waldenström *et al.*, en 2010 afirmaron que para entender mejor la biología de *Campylobacter* spp. en las aves silvestres, es necesario abordar una serie de

cuestiones fundamentales para dilucidar el papel de las aves silvestres como reservorios de *Campylobacter* spp., identificar cepas específicas, el tiempo que tarda en infectar las aves silvestres y si la duración y la intensidad de la diseminación bacteriana varía dependiendo del origen de la cepa. Por otra parte, habría que preguntarse si la infección por *C. jejuni* tiene algún efecto evidente en la condición corporal, o son las aves silvestres portadores asintomáticas como las aves de producción.

En la UE el único país que ha notificado datos de *Campylobacter* spp. en especies silvestres ha sido Italia, donde se aisló en 25 de 184 aves silvestres muestreadas, lo que supone un 13,6%, 13 de 253 jabalís (5,4%), 1 rebeco de 89 muestreados (1.12%), 7 corzos de 195 (3,59), 2 zorros de 97 (2,6%) y 8 palomas de 77 muestreadas (10,39), en este mismo año en Italia no se identificó *Campylobacter* spp. en muestras de un muflón, treinta y ocho ciervos, treinta y cuatro liebres, ocho gamos y tres cabras (EFSA, 2016) y el año anterior tampoco se detectó en un tejón, dos osos, cuatro rebecos, seis ciervos, cuatro gamos, setenta y ocho corzos, ciento doce zorros, cuarenta y seis liebres, seis lince y setenta y cuatro palomas que fueron muestreados (EFSA, 2015).

2.5. La infección por *Salmonella* spp.

2.5.1. Contexto histórico.

En 1885 Salmon y Smith aislaron por primera vez este microorganismo, a partir de cerdos cuando estudiaban «la peste porcina», desde entonces *Salmonella* spp. ha sido objeto de muchos estudios en todo el mundo. El pionero en el estudio de la fiebre tifoidea fue Thomas Willis quien describió la enfermedad en 1659 (Adelantado *et al.*, 2008). En 1826, Trousseau describió la fiebre tifoidea desde el punto de vista patológico, y la diferenció de otras infecciones gastrointestinales. Describió la inflamación de las placas de Peyer e hizo una descripción detallada de lesiones post-mortem (Kelterborn, 1967). Hoy en día, se reconocen más de 2500 serotipos de *Salmonella* spp. y esta lista aumenta cada año (OMS, 2005). Casi todos los serotipos de *Salmonella* spp. se cree que son capaces de causar enfermedades en los seres humanos. La epidemiología de la enfermedad humana está dominada por solo algunos serotipos. A finales de 1970, *S. Typhimurium* fue el más común y *S.*

Agona antes de este (Harbour *et al.*, 1978). Muchos de estos picos de infección han sido asociados con un alimento en particular o animal transmisor, como *S. Enterítidis* con aves de corral.

2.5.2. Taxonomía y características.

El género *Salmonella* se clasifica en la familia *Enterobacteriaceae*, inicialmente se consideraba que el género incluía más de dos mil especies y se utilizaron nombres representativos para darles nombre, por ejemplo, del origen geográfico donde el agente fue aislado por primera vez (*Salmonella montevideo*); más tarde las investigaciones mostraron que se trataba de serotipos y que en realidad solo había dos especies de *Salmonella*: *S. entérica* y *S. bongori* (Delgado Fernández, 2015). El Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal (sus siglas en inglés OIE), correspondiente al año 2016, como ya establecieron Grimont y Weill, en 2008, divide el género *Salmonella* en sólo dos especies: *S. entérica* y *S. bongori*. *Salmonella entérica* se divide en seis subespecies, que se distinguen por ciertas características bioquímicas y la susceptibilidad a la lisis por bacteriófago Felix O1 (Tabla 3).

Tabla 3. Subespecies de la especie *Salmonella entérica*.

<i>S. entérica</i>
Subespecie I o subespecie <i>entérica</i> .
Subespecie II o subespecie <i>salamae</i> .
Subespecie IIIa o subespecie <i>arizonae</i> .
Subespecie IIIb o subespecie <i>diarizonae</i> .
Subespecie IV o subespecie <i>houtenae</i> .
Subespecie VI o subespecie <i>índica</i> .

El símbolo V se reserva para los serotipos de *S. bongori*, para evitar la confusión con los nombres de los serotipos de *S. entérica* subsp. *entérica*.

Las cepas de *Salmonella* spp. se clasifican en serotipos sobre la base de una amplia diversidad de lipopolisacáridos (LPS) o antígenos O y proteínas flagelares o

antígenos H de acuerdo con el esquema de Kauffmann-Minor (Issenhuth-Jeanjean *et al.*, 2014) y actualmente se reconocen más de 2 600 serotipos.

Se trata de bacilos Gram-negativos no encapsulados. Con la excepción de *S. Gallinarum* y *S. Pullorum*, todas las especies del género *Salmonella* son móviles, ya que tienen flagelos (Van de Giessen, 1996). El organismo mide 0,7-1,5 μm de ancho y 2,0-5,0 μm de largo. *Salmonella* spp. son bacterias anaerobias facultativas y por lo general utilizan el citrato como única fuente de carbono. La tasa de crecimiento de *Salmonella* spp. depende de varios factores como la temperatura, el pH, la actividad del agua y los nutrientes (Meneses, 2010). Las especies del género *Salmonella* pueden crecer en un rango de temperaturas entre 10° y 49 °C, con una temperatura óptima de crecimiento aproximadamente de 37 °C. A temperaturas entre 0 y 5 °C, siguen siendo viables a pesar de que no hay crecimiento (Zeraik y Nitschke, 2012). Sin embargo, hay una marcada reducción en el número de *Salmonella* spp. durante la congelación y el almacenamiento en congelación a largo plazo, pero no todas las bacterias son destruidas (Shah *et al.*, 2013). La *Salmonella* spp. se inactiva cuando se exponen a temperaturas de 55°C durante una hora o 60°C durante 15 a 20 minutos (Aljarallah y Adams, 2007). La cocción de los alimentos destruirá las *Salmonella* spp. si la temperatura interna de los alimentos alcanza 74 a 77 °C. Sin embargo, los procedimientos de cocción de uso doméstico usados para los huevos y los alimentos que contienen huevo son a menudo insuficientes para garantizar un alimento seguro (Coetzer y Tustin, 2004).

El pH óptimo para el crecimiento de *Salmonella pp.* se encuentra entre 6,5 y 7,5, con posibilidades de crecimiento en medios con un intervalo de pH de 4,5 a 9,0 (Zeinali *et al.*, 2012) valores inferiores o superiores a este intervalo provocan la muerte de la bacteria. *Salmonella* spp. crece con actividades de agua por encima de 0,93 (Beuchat y Mann, 2010). Resisten la falta de humedad y puede sobrevivir a la temperatura ambiente durante períodos prolongados (Gruzdev *et al.*, 2011) en el material fecal, en estiércol o en los pastos (Kušar *et al.*, 2010). *Salmonella* spp. es sensible a la irradiación gamma (Clavero *et al.*, 1994; Rodrigues *et al.*, 2011) y a los ácidos orgánicos (de Ávila *et al.*, 2013).

2.5.3. Aspectos clínico-epidemiológicos de la salmonelosis humana.

Salmonella spp. es una de las principales causas de gastroenteritis bacterianas en humanos, en todo el mundo (EFSA, 2016). Se puede transmitir a través del contacto directo con animales infectados o de forma indirecta por contaminaciones fecales. La presentación más común de la infección por *Salmonella* spp. no tifoidea es gastroenteritis aguda (Van de Giessen, 1996) y su inicio se produce por lo general entre unas pocas horas y 3-4 días después de la ingestión del agente infeccioso (Santana *et al.*, 2012). La salmonelosis humana generalmente se caracteriza por fiebre aguda, dolor abdominal, náuseas y en ocasiones diarrea (EFSA, 2014). Los síntomas suelen ser leves y la mayoría de las infecciones son autolimitantes y duran unos pocos días (Scherer *et al.*, 2008). Sin embargo, en algunos pacientes, la infección puede ser más grave y la deshidratación asociada puede ser potencialmente mortal. En estos casos, así como cuando se provoca infección del torrente sanguíneo, los antimicrobianos eficaces son esenciales para el tratamiento. La salmonelosis también se ha asociado con efectos a largo plazo y a veces crónicos como por ejemplo la artritis reactiva (Colmegna *et al.*, 2004).

Millones de casos de salmonelosis humana son declarados en todo el mundo cada año provocando miles de muertes (OMS, 2005). Un total de 96 144 casos de salmonelosis fueron notificados por 28 Estados miembros de la UE en 2015, con 94 625 casos confirmados, resultando una tasa de notificación en la UE de 21,2 casos por 100.000. Esto representó un pequeño aumento, del 1,9%, en la tasa de notificación de la UE en comparación con 2014 (20,8 casos por 100.000). En España, la mejora del sistema de vigilancia de la salmonelosis en 2015 dio lugar a un aumento de los casos confirmados en un 36,5%. Se observó una tendencia estacional para el número de casos de salmonelosis confirmados en la UE / EEE en 2008-2015, con la mayoría de los casos notificados durante los meses de verano. En el mismo período de 8 años, a pesar del aumento general de los casos notificados en el período de 2 años 2014-2015, hubo una tendencia general decreciente ($p < 0,01$) estadísticamente significativa para la salmonelosis en la UE / EEE. Doce Estados miembros (Austria, Chipre, Dinamarca, Estonia, Finlandia, Alemania, Irlanda, Italia, Lituania, Luxemburgo, Eslovenia y Suecia) informaron tendencias

decrecientes entre 2008 y 2015. En cambio, se observó una tendencia creciente significativa en tres Estados miembros (la República Checa República, Francia y España)(EFSA, 2016).

Al igual que en años anteriores, las tres serovariantes de *Salmonella* más frecuentes en 2015 fueron *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*, y monofásicos *S. Typhimurium* 1,4, [5], 12: i: -, representando 69,8%, entre 69 663 humanos confirmados casos con serovariante conocida. La proporción de *S. Enteritidis* aumentó en comparación con 2013 y 2014, la proporción de *S. Typhimurium* disminuyó mientras que sus cepas variantes monofásicas 1,4, [5], 12: i: - se mantuvieron al mismo nivel estable que en 2014. Los casos de *S. Infantis* continuaron disminuyendo en 2015. Los casos de *S. Stanley* aumentaron ligeramente en 2015, pero se mantuvieron en un nivel inferior con respecto a 2013. Dos "nuevas" serovariantes (*Salmonella* Panamá y *Salmonella* Thompson) entraron en la lista de los 20 primeros en 2015 (EFSA, 2016)..

La proporción de casos nacionales frente a los casos asociados a los viajes varía notablemente de un país a otro, con las proporciones más elevadas de casos nacionales, que van del 85,9% al 100%, en Alemania, Grecia, Hungría, Letonia, Lituania, Malta y Países Bajos , Portugal y Eslovaquia. Tres países nórdicos registraron las proporciones más elevadas de casos relacionados con viajes: Finlandia (72,6%), Suecia (68,1%) y Noruega (69,4%). Entre los 9.489 casos asociados a viajes, Tailandia, Turquía y España se declararon con mayor frecuencia como probable país de infección (22,0%, 15,5% y 7,3%, respectivamente, de los casos importados con probable probable país de infección) (EFSA, 2016).. Se observó una tendencia estacional en el número de casos de salmonelosis confirmados en la UE/EEE en 2008-2015, con la mayoría de los casos notificados durante los meses de verano. En el mismo período de 8 años, a pesar del aumento general de los casos notificados, en el período de 2 años 2014-2015, hubo una tendencia general decreciente ($p < 0,01$) estadísticamente en la UE / EEE. Doce Estados miembros (Austria, Chipre, Dinamarca, Estonia, Finlandia, Alemania, Irlanda, Italia, Lituania, Luxemburgo, Eslovenia y Suecia) informaron de tendencias decrecientes entre 2008 y 2015. En cambio, se observó una tendencia creciente significativa en tres Estados miembros (la República Checa República, Francia y España) (EFSA, 2016).

La tasa de hospitalización de los casos de salmonelosis en la UE, fue del 34% en 2015, y en este año se produjeron un total de 126 casos fatales en 16 estados miembro. Esto da una mortalidad en la UE del 0,24% entre los 52 605 casos confirmados para los que esta información estaba disponible. Más de la mitad de los casos (65 casos; 51,6%) fatales de salmonelosis, fueron notificados por el Reino Unido en 2015 (EFSA, 2016).

2.5.4. Papel epidemiológico de las aves en la salmonelosis.

La infección por *Salmonella* spp. se produce cuando el microorganismo se introduce en las aéreas de preparación de los alimentos y se permite su multiplicación en ellos, por ejemplo por, temperaturas de almacenamiento inadecuadas, procesos de cocinado inadecuados, y contaminaciones de comidas preparadas (EFSA, 2014). Un reservorio muy habitual de *Salmonella* spp. es el tracto intestinal de una amplia gama de animales domésticos y silvestres, que pueden influir en una gran variedad de productos alimenticios de origen animal y vegetal (Obukhovska, 2013). Se ha demostrado que productos lácteos (Skirrow y Blaser, 2000), la carne de ternera (Koochmaraie *et al.*, 2012), el pescado (David *et al.*, 2009), la carne de cerdo (Meyer *et al.*, 2010), la carne de ave y los huevos (Fearnley *et al.*, 2011) y la fruta y los vegetales (Gautam *et al.*, 2014) son vehículos en la transmisión humana de la salmonelosis. La mayor ocurrencia de muestras no conformes con los criterios de la UE para la salmonella se encontró en alimentos de origen cárnico que están destinados a ser cocinados antes del consumo. Entre estos alimentos, "carne picada y preparados de carne de aves de corral" presentaron un nivel notable de incumplimiento (6,8% de muestras individuales y 5,1% de lotes), con valores similares al del año anterior. La salmonela se detectó con mayor frecuencia en carne de pollo (6,5%) y carne de pavo (4,6%), mientras que en la carne de cerdo (1,7%) y carne bovina (0,2%) se encontró un menor número de muestras positivas en 2015 y se encontró raramente en huevos de consumo (0,9%, en muestras individuales) (EFSA, 2016).

Las contaminaciones en las cocinas, se consideran un gran riesgo para la infección por *Salmonella* spp. en humanos, donde se produce la contaminación entre productos crudos de pollo y las manos, utensilios de cocina y otros alimentos, siendo

el origen de gran parte de las infecciones por *Salmonella* spp. en el hombre. Prácticas sanitarias deficientes, el diseño de los equipos y la falta de control de los ingredientes utilizados, son los principales factores que influyen en la contaminación (Podolak *et al.*, 2010). Se ha observado una importante relación entre infecciones por *S. Enteritidis*, comidas al aire libre a base de carne de pollo y huevos mal cocinados (Marcus *et al.*, 2007).

En España, el mayor brote de infección por *Salmonella* spp. ocurrió el 28 de julio de 2005. El Centro Nacional de Epidemiología, declaró 2 000 casos, y fue asociado al consumo de pollo asado precocinado y envasado al vacío.

Salmonella spp. ha sido aislado de una amplia variedad de animales silvestres, como describe Mörner, (2001) en mamíferos, Morishita *et al.*, (1997) en rapaces y Wilson y MacDonald, (1967) en aves silvestres en general. Se reconoce como causa de muerte en algunas especies silvestres, principalmente pequeños paseriformes (Cruchaga *et al.*, 2001; Handeland *et al.*, 2002). Sin embargo, la relevancia de los animales silvestres en la epidemiología de la salmonelosis, es su papel como portadores asintomáticos de una amplia gama de serotipos de *Salmonella* spp., como lo observado, por ejemplo, por Hudson *et al.*, en 2000 en los EEUU de América o Refsum *et al.*, en Noruega en 2002. En muchos países europeos el serotipo Typhimurium se ha establecido en aves silvestres (Kapperud *et al.*, 1998) y erizos (*Erinaceus europaeus*) (Jørgensen, 2001; Handeland *et al.*, 2002), que actúan como reservorio y pueden transmitir la infección a los seres humanos (Tauni y Osterlund, 2000; Handeland *et al.*, 2002) o el ganado (Humphrey y Bygrave, 1988).

Se sabe muy poco sobre el papel de la vida silvestre como reservorio de *Salmonella* spp. en España. Algunas cepas se han encontrado en rapaces en cautividad y reptiles (Usera *et al.*, 2001), pero hay muy pocos datos disponibles comparado con la información disponible para especies ganaderas. Por ejemplo, en muestras de suero de jabalíes europeos (*Sus scrofa*) (Vicente *et al.*, 2002) encontraron una baja seroprevalencia (3-4%) de anticuerpos de *Salmonella* spp. en títulos significativos (a partir de 1:160).

Los animales silvestres constituyen un importante reservorio de *Salmonella* spp. y un riesgo potencial para los seres humanos y la ganadería (Millan *et al.*, 2004). Por el

contrario, otros estudios, como el realizado por Girdwood *et al.*, en 1985 en Escocia con gaviotas, en el que se observó una duración máxima de la excreción de *Salmonella* spp. en 17 ejemplares de los 84 mantenidos en laboratorio, de 4 días y el número de *Salmonella* spp. excretado nunca fue más de 170 microorganismos por gramo de heces, con un promedio de 22, lo que sugiere que no representan un peligro para la salud pública, dado el bajo número y la corta duración de la excreción de *Salmonella* spp.

2.6. La infección por *Mycoplasma* spp.

2.6.1. Contexto histórico de las micoplasmosis aviares.

La presencia de *Mycoplasma* spp. en aves rapaces fue detectada por primera vez por Furr, Cooper y Taylor-Robinson, en 1977, que aislaron tres cepas en halcones en cautividad (*Falco cherrug* y *Falco peregrinus*), que no se correspondían con las seis especies de micoplasmas aviares descritas hasta ese momento. Bolske y Morner, (1982) aislaron tres cepas de micoplasma en ratoneros (*Buteo buteo* y *Buteo lagopus*) que no reaccionaban con antisueros frente a las especies de micoplasmas conocidas. Poveda, en 1988 encontró *M. gallisepticum*, *M. gallinarum*, *M. gallinaceum* y *M. iners* en un halcón peregrino en cautiverio, alimentado con cadáveres de pollo.

La primera referencia de *Mycoplasma* spp. en aves carroñeras en España se obtiene de un buitre negro (*Aegypius monachus*) del que se aisló *M. gallinarum* de tráquea, pulmón y sacos aéreos, y de dos buitres leonados procedentes de un santuario de aves silvestres en Málaga que mostraban signos respiratorios no específicos como respiración y sibilancias irregulares, secreción mucosa por la nariz y el pico y anorexia, y que finalmente murieron. De los buitres leonados se aislaron dos cepas de micoplasma que no pudieron ser identificadas por no reaccionar con antisueros de especies conocidas, por lo que podían tratarse de especies nuevas (Poveda, Carranza, *et al.*, 1990). Fueron también Poveda *et al.*, en 1994, quienes describieron el aislamiento de organismos con características típicas de *Mycoplasma* spp. de la tráquea de buitres leonados en cautividad y con presencia de enfermedad respiratoria. Se aislaron 8 cepas, que parecían ser idénticas serológicamente y

distintas de las cepas aisladas de otras especies de aves rapaces y distintas también de las especies de *Mycoplasma*, *Entomoplasma*, *Mesoplasma*, y *Acholeplasma* anteriormente descritas. Los resultados mostraban que se trataba de una nueva especie, que denominaron *M. gypis*.

Del cadáver de un buitre bengalí (*Gyps bengalensis*) muerto con síntomas de intoxicación por diclofenaco en Paquistán, fue aislada una cepa de micoplasma desconocida hasta el momento, por sus propiedades bioquímicas y físicas, las características ultraestructurales, y la secuenciación del 16S ARN ribosomal se clasificó este organismo como un nuevo taxón de *Mycoplasma*, y se denominó *Mycoplasma vulturii* (Oaks *et al.*, 2004).

La presencia de *Mycoplasma* spp. ha sido detectada también, en el tracto respiratorio superior de cuatro buitres leonados enfermos, de un centro de rehabilitación en Ficuzza, cerca de Palermo en Sicilia, antes de su reintroducción en la naturaleza. Los animales provenían de España. Se aislaron y caracterizaron *Mycoplasma gallinarum*, y tres micoplasmas no identificados, uno muy similar a *Mycoplasma glycyphilum*, y dos con similitudes con *Mycoplasma falconis* y *Mycoplasma gateae* (Loria *et al.*, 2008).

Mycoplasma corogypsi fue aislado del líquido articular de un buitre negro americano (*Coragyps atratus*) con imposibilidad de volar y que presentaba síntomas de intoxicación por plomo, con una leucocitosis prominente. La evaluación histopatológica reveló una poliartritis aguda fibrinoheterofílica (Ruder *et al.*, 2009).

Mycoplasma spp. son gérmenes comensales y patógenos de diferentes especies de aves, especialmente en aves de corral y paseriformes (Lierz *et al.*, 2007). En aves de presa el papel de *Mycoplasma* spp. como agentes patógenos todavía no está claro (Lierz *et al.*, 2008; Loria *et al.*, 2008). Polluelos sanos de rapaces, criados en libertad, aunque ninguna de ellas necrófaga, muestreados durante un programa de anillado de rutina, y aves de presa de centros de rehabilitación de Alemania, dieron positivo para *Mycoplasma* spp. por cultivo y reacción en cadena de la polimerasa (sus siglas en inglés PCR) específica de género (PCR). Dada la ausencia de signos clínicos y de enfermedad, se sugiere que los *Mycoplasmas* spp. en las rapaces pueden ser comensales no patógenos (Lierz *et al.*, 2007).

2.6.2. Taxonomía y características.

Las bacterias del género *Mycoplasma*, pertenecen a la clase Mollicutes. Dentro de esta clase, el género *Mycoplasma* es probablemente el de mayor relevancia, por lo que de forma general se identifica el término Mollicutes con *Mycoplasma*. El Subcomité para la Taxonomía de Mollicutes aceptó en 2003 la taxonomía revisada de esta clase (Tabla 4).

Tabla 4. Taxonomía de la Clase Mollicutes.

DIVISIÓN IV TENERICUTES
CLASE I MOLLICUTES
ORDEN I MYCOPLASMATALES
FAMILIA MYCOPLASMATACEAE
GÉNERO <i>MYCOPLASMA</i>
GÉNERO <i>UREAPLASMA</i>
ORDEN II ENTOMOPLASMATALES
FAMILIA I ENTOMOPLASMATACEAE
GÉNERO <i>ENTOMOPLASMA</i>
GÉNERO <i>MESOPLASMA</i>
FAMILIA II SPIROPLASMATECEAE
GÉNERO <i>SPIROPLASMA</i>
ORDEN III ACHOLEPLASMATALES
FAMILIA I ACHOLEPLASMATACEAE
GÉNERO <i>ACHOLEPLASMA</i>
ORDEN IV ANAEROPLASMATALES
FAMILIA ANAEROPLASMATACEAE
GÉNERO <i>ANAEROPLASMA</i>
GÉNERO <i>ASTEROLEPLASMA</i>

Las peculiaridades de estas bacterias condicionan que su manipulación requiera de laboratorios especializados y en ocasiones destinados exclusivamente a su estudio. Son organismos comensales o patógenos de una gran cantidad de individuos, que van desde plantas hasta animales, incluyendo insectos. Taxonómicamente, se considera un grupo con entidad suficiente como para englobarlo en una división

aparte, Tenericutes, que presenta 1 clase, 4 órdenes y 8 géneros distintos (Miles y Nicholas, 1998).

Son los procariontes más pequeños con replicación autónoma y se trata de un grupo de microorganismos que difieren de otras bacterias, entre otras cosas, carecen de una pared celular (Nicolet, 1996). Su tamaño oscila entre 0.1 y 0.25 μm y su volumen celular equivale al 5% de un bacilo típico. Poseen solo aquellos orgánulos y rutas metabólicas, necesarios para su crecimiento y replicación. Su estructura se reduce a una membrana citoplasmática, similar a la de organismos eucariotas, una molécula bicatenaria circular de ADN, moléculas de ARN, ribosomas y gránulos citoplasmáticos. Al carecer de pared celular, es necesaria una elevada presión osmótica en el medio donde se desarrolla, para garantizar el equilibrio osmótico entre el medio y el interior de la bacteria (Poveda *et al.*, 2002).

2.6.3. Micoplasmosis aviarias.

Durante mucho tiempo se ha reconocido que los micoplasmas son, al menos en lo que respecta a las especies patógenas, altamente específicos del huésped. De hecho, la mayoría de los micoplasmas se adaptan a un huésped principal en el que son comúnmente patógenos. A veces colonizan otros huéspedes, a menudo sin expresar plenamente su patogenicidad (Nicolet, 1996).

Mycoplasma gallisepticum es el más importante de los micoplasmas aviarias patógenos, afecta a pollos y pavos y es especialmente grave en pollos de engorde, en los que a menudo actúa sinérgicamente con otros agentes, como virus respiratorios o cepas patógenas de *Escherichia coli*, para provocar enfermedades respiratorias crónicas. En las aves de puesta, también puede causar la pérdida de la producción de huevos. *Mycoplasma synoviae* afecta a pollos y pavos y, en ciertas circunstancias, puede contribuir a la enfermedad respiratoria, mientras que en aves pesadas, puede causar sinovitis y artritis. *Mycoplasma meleagridis*, en pavos puede causar una reducción de la eclosión y reducción de la viabilidad de las aves jóvenes y también puede causar la enfermedad de los sacos aéreos. *Mycoplasma iowae*, afecta principalmente al embrión de pavo, en el cual algunas cepas son letales. Las industrias de pollo y pavo han invertido grandes esfuerzos en la producción de animales reproductores primarios libres de estos patógenos, y también mantienen

costosos programas de bioseguridad y vigilancia serológica para protegerse contra la reinfección (Bradbury, 1998).

Debido a su escaso material genético y a su debilidad por carecer de pared bacteriana, utilizan diversos métodos de propagación para asegurar su supervivencia. Puede transmitirse de manera vertical de padres a hijos, a través del huevo, y entre individuos por contacto directo o indirecto (Bradbury, 1998). Polluelos sanos, criados en libertad, de rapaces muestreados durante un programa de anillado de rutina, y aves de presa de centros de rehabilitación, dieron positivo para *Mycoplasma* spp. por cultivo y PCR específica de género. La ausencia de signos clínicos y de enfermedad, en estos ejemplares, sugiere que los micoplasmas en las rapaces pueden ser comensales no patógenos (Lierz *et al.*, 2008), pudiendo actuar como transmisores del germen.

La transmisión tiene lugar por contacto directo, a menudo a través de la vía aérea, por contacto indirecto como ocurre en el caso de la mastitis por el ordeño, o a través de la vía genital, es decir, los huevos. La gravedad de los síntomas y la propagación de la infección dependen de la patogenicidad de las especies de micoplasmas particulares o de la cepa en particular, así como de la acción conjunta de los factores predisponentes (Nicolet, 1996).

En aves rapaces, el contagio podría producirse al ingerir presas enfermas o infectadas, Poveda *et al.*, 1990a, detectó *M. columborale* en un halcón peregrino, especie que ha sido previamente aislada sólo de palomas. Es posible que el halcón peregrino se infectara con esta especie de micoplasma devorando palomas.

2.6.4. El estatus sanitario de las aves necrófagas como factor colectivo: Interacción con las especies domésticas y la especie humana.

Durante las últimas décadas, la influencia de los patógenos como agente causante de enfermedad y producir mortalidad en las poblaciones de animales silvestres y, por tanto, como elemento importante en su dinámica poblacional, ha cobrado un gran interés, debido a la aparición de nuevas enfermedades, de nuevas variantes de éstas, o de enfermedades conocidas pero con efectos desconocidos en estas

especies, que pueden causar importantes mortandades o graves alteraciones en su reproducción, y que se conocen como enfermedades emergentes o re-emergentes, y que están asociadas, en muchas ocasiones a actividades humanas, como la ganadería (Daszak *et al.*, 2000; Antia *et al.*, 2003). La globalización en el transporte de productos de consumo humano por todo el planeta ha contribuido a su dispersión generalizada (Southern *et al.*, 2006; Doyle y Erickson, 2006) y al contacto entre estos productos y la fauna silvestre, que ha pasado así a ser reservorio y dispersante de muchos patógenos que pueden afectar de forma negativa la salud de sus poblaciones y de la población humana (Hubálek, 2004; Weber y Stilianakis, 2008).

La ubicación de explotaciones ganaderas en los propios espacios naturales o en sus áreas de influencia, provoca la posibilidad de los patógenos lleguen a las especies de fauna silvestre, mucho más susceptibles a ellos debido a la ausencia de contacto previo (Antia *et al.*, 2003). De hecho, un agente infeccioso puede ser tanto más agresivo con su hospedador cuanto menor es el tiempo evolutivo que ha estado en contacto con él (Clayton y Moore, 1997; Dybdahl y Lively, 1998; Carius *et al.*, 2001). Así, hay enfermedades emergentes en aves silvestres producidas por cepas atípicas o serotipos de las bacterias *Salmonella* spp. y *Escherichia coli* enterotoxigénica, causante de la colibacilosis en milanos reales (*Milvus milvus*), buitres negros, (*Aegypius monachus*), alimoches (*Neophron percnopterus*) y quebrantahuesos (*Gypaetus barbatus*) (Blanco *et al.*, 2007a; 2007b).

La mala utilización de los antibióticos y antimicrobianos es la principal causa de la creación de resistencias bacterianas a tales fármacos, lo que representa uno de los principales problemas de salud pública a los que se enfrenta la medicina actual en todo el mundo (Baquero y Blázquez, 1997; Levy, 2002; O'Brien, 2002; Molbak, 2004). Las prácticas ganaderas han utilizado los antibióticos de forma masiva, contribuyendo de forma esencial a este problema (Angulo *et al.*, 2000; Aarestrup, 2005). Las aves rapaces, tanto depredadoras como carroñeras se han visto afectadas por este proceso, debido a las consecuencias de su interacción con las actividades ganaderas, de las que obtienen la mayoría de su alimento en gran parte de sus áreas de distribución mundial, afectando a su microbiota y convirtiéndose en reservorios y vehículos para la dispersión de bacterias resistentes (Blanco *et al.*,

2007a,2007b; Dolejska *et al.*, 2007; Literak *et al.*, 2007), muchas de las cuales son patógenos responsables de múltiples zoonosis (Daszak *et al.*, 2000; Dobson y Foufopoulos, 2001; Swartz, 2002).

En buitres silvestres, Millan *et al.*, (2004), Molina-Lopez *et al.*, (2011) y Vela *et al.*, (2015) evalúan la presencia de *Salmonella* spp. y, a nuestro entender, sólo Molina-Lopez *et al.*, (2011) y Vela *et al.*, (2015) evalúan la presencia de *Campylobacter* spp. En este contexto, en España existe la población de buitre leonado más importante de Europa (Hamemeijer y Blair, 1997; Del Moral y Marti, 2001; Camiña, 2004). La protección de las colonias de cría, la limitación de la persecución directa (disparos) y una reducción en el uso de venenos han ayudado a la recuperación de la especie. Esto no habría sido posible sin la disponibilidad de canales de ganado, abundantes en España, y la legislación que no obligaba a que los cadáveres fueran enterrados o quemados (Camiña, 2004).

Estudios recientes, especialmente tras la imposición de un plan de control y erradicación de *Salmonella* spp. en avicultura, regulado por el Reglamento (CE) 2160/2003 (CE, 2003), demuestran la implicación de la carne de porcino como fuente de salmonelosis humana (Wales *et al.*, 2013). La especie porcina es reservorio habitual de patógenos de importancia pública como *Salmonella* spp., *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Dublín*, y *S. Cholerasuis*, (Kingsley y Bäumlér, 2000), así como de otras bacterias enteropatógenas como *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp., *Pseudomonas* spp., y Erisipelas (*Erysipelothrix rhusiopathiae*), así como *Pasterella multocida*. Sus efectos en aves carroñeras no suelen manifestarse como brotes epidémicos, sino más bien como casos puntuales que pueden ser destacables al afectar a individuos de especies o poblaciones muy amenazadas, como el alimoche canario (*Neophron percnopterus majorensis*) y el quebrantahuesos (*Gypaetus barbatus*) (Blanco *et al.*, 2007a). *Salmonella* spp., es normalmente asintomática en esta especie, por lo que es muy importante realizar muestreos de control a nivel de granja para poder diagnosticarla. Trabajos realizados en el buitre leonado, han puesto en evidencia la especie porcina como una fuente de infección en estas especies (Del Moral y Marti, 2001; Millan *et al.*, 2004). Es importante destacar que *S. Typhimurium*, es el segundo agente causal de salmonelosis humana (Del Moral y Martí, 2001; Millan *et al.*, 2004;EFSA, 2016), y ha sido aislada en buitre

leonado (Millan *et al.*, 2004). Por tanto, los buitres infectados y asintomáticos de salmonelosis, desempeñan un papel relevante actuando como vector diseminador y amplificador de la bacteria, pudiendo infectar a otras especies silvestres y domésticas (Reche *et al.*, 2003). Sin embargo, no existen estudios previos donde se demuestre la relación entre las serotipos aislados en los buitres y los serotipos aislados en los cadáveres de los cerdos.

Por otra parte, la ubicación de los muladares, su diseño y la manera de depositar los subproductos ganaderos para la alimentación de aves necrófagas, producen, en muchos casos, el hacinamiento de estas aves, especialmente buitres, durante largos periodos de tiempo mientras se alimentan, lo que puede suponer un importante factor de riesgo. Un solo buitre infectado puede provocar la propagación de un patógeno por múltiples vías, al coincidir con gran cantidad de congéneres y ejemplares de otras especies al mismo tiempo sobre las carroñas. Los subproductos administrados, suelen concentrarse en muy poco espacio, incluso se disponen unos cadáveres encima de otros, lo que permite un contagio pasivo de patógenos entre ellos. Por otra parte, las formas de resistencia de los microorganismos pueden permanecer en el medio ambiente durante mucho tiempo, pudiendo infectar directamente a los individuos por ingestión o indirectamente al quedar sobre los cadáveres (Blanco, 2014a).

La acumulación de restos no consumidos en descomposición, puede producir la proliferación de enterobacterias y bacterias de la putrefacción, como *Serratia liquifaciens*, *Klebsiella oxytoca*, o *Staphilococcus* spp. Estas acumulaciones pueden también servir como reservorio de las formas de resistencia de otras especies patógenas primarias como los *Clostridium* spp. (*Clostridium perfringens*, *botulinum*, *putrificans*), o *Escherichia coli* enterotoxigénica (Mackey y Derrick, 1979). *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. y *Erysipelothrix rhusiopathiae* patógenos comunes en las explotaciones intensivas de porcino y que se transmiten de unos individuos a otros, incluso entre canales en matadero (Russell, 1998; Cason *et al.*, 1997; Nou *et al.*, 2003) y que están presentes de manera constante en el muladar debido a su resistencia en el medio ambiente, tanto por su persistencia en la materia orgánica o en aguas estancadas como por sus esporos de resistencia, pueden

extenderse fuera de los límites de los muladares y afectar a comunidades enteras, así como contaminar acuíferos y suelos (Sarmah *et al.*, 2006).

Este entorno en el que se dan las condiciones favorables descritas para el crecimiento de muchos patógenos, es uno de los problemas más desconocidos producidos por el uso de muladares por las aves carroñeras, y puede ser la causa de una parte importante de los brotes de mortalidad de los pollos en sus nidos, sobre todo en las especies más gregarias en sus hábitos de nidificación y alimentación. Los muladares como focos de concentración y fuente de la transmisión de patógenos, han sido poco estudiados y no se han tenido en cuenta en la epidemiología de algunas zoonosis, a pesar de que los cadáveres aportados no pasan, por lo general, por los cauces generales de inspección veterinaria de los mataderos, aumentando el riesgo de una posible infección accidental. Esta vía de transmisión debería ser tomada en cuenta al estudiar la epidemiología de muchos patógenos, ya que en muchos casos las plumas se han descrito como vehiculadores y reservorios de patógenos, incluidos virus (Davison *et al.*, 2008).

La presencia de otras especies carroñeras en los muladares (ratas principalmente), y pequeños córvidos aumentan la posibilidad de transmisión de patógenos, especialmente bacterias como *Mycobacterium* spp. Es bien conocida la alta susceptibilidad de los córvidos y de las ratas a las micobacterias (Hubálek, 2004; Delahay *et al.*, 2002), además de ser transmisores y propagadores de los patógenos existentes (especialmente virus), así como de otros patógenos que no se encuentran habitualmente en los muladares (Ostfeld y Keesing, 2000).

3. OBJETIVOS.

3. OBJETIVOS.

En este contexto se plantean unos **objetivos específicos** que han sido abordados durante la realización de esta Tesis Doctoral:

- Identificar la presencia de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. y *Mycoplasma* spp. en buitres leonados silvestres de la provincia de Castellón.
- Caracterizar genéticamente los aislamientos de *Salmonella* spp. procedentes tanto de los buitres analizados como de explotaciones de porcino proveedoras de cadáveres, de las superficies en contacto con los mismos (vehículo y caseta de almacenamiento) y de los cadáveres del muladar, al objeto de establecer su relación filogenética.

4. MATERIAL Y MÉTODOS.

4. MATERIAL Y MÉTODOS.

Todos los animales fueron manejados de acuerdo a las normas de Bienestar Animal incluidas en el Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen «las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia» (BOE, 2013). La Consellería de Infraestructuras, Territorio y Medio Ambiente de la Generalitat Valenciana concedió el permiso para la toma de muestras. Este estudio, que comprendió dos experimentos que necesitaron una serie de capturas, se llevó a cabo dentro del proyecto de control y anillamiento de las aves silvestres llevado a cabo por la Generalitat Valenciana.

4.1. Experimento 1. Presencia de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. y *Mycoplasma* spp. en el buitre leonado.

4.1.1. Población y diseño.

La población de estudio se encontraba en el este de España, en el noroeste de la provincia de Castellón. Dicha población estaba alimentada artificialmente por medio de 4 muladares. Las capturas se realizaron a través de un muladar operado por la Consellería de Agricultura, Medio Ambiente, Cambio Climático y Desarrollo Rural (40°33'N, 0°13'W), ubicado en el término municipal de Cincorres, paraje de la *Creu del Gelat*, limitando con la provincia de Teruel. La edad de los animales se determinó de acuerdo con algunas características físicas que varían en función de la edad, que fueron el color del plumaje, el color del pico y el color del iris. Se establecieron tres grupos de edad: juvenil (menos de 2 años); subadulto (entre 2 y 5 años) y adulto (más de 5 años).

Para este primer experimento, diseñado para determinar la presencia de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. y *Mycoplasma* spp. en la población de buitres en estudio, se realizaron una serie de capturas entre 2013 y 2016. Este muladar no recibe aportes regulares durante todo el año, sino que se aportaron cadáveres de porcino durante las semanas previas a las capturas para acostumar a los buitres a acudir a la jaula-trampa. Una vez adaptados a este tipo de alimentación, se procede a la captura de los animales. Para ello se depositaron los cadáveres de los cerdos

en el interior de la jaula-trampa a primera hora de la mañana. El personal se alejó del muladar a una distancia prudencial para que los buitres no se vieran intimidados por su presencia. Mediante prismáticos se observó el comportamiento de los buitres hasta que uno de ellos bajo a comer, siguiéndole el resto de la bandada que estaba posada en los aledaños. En ese momento se activó el control remoto que cierra la puerta de la jaula, quedando los buitres dentro (Figura 8).



Figura 8. Trampa utilizada para capturar los buitres silvestres (*Gyps fulvus*) en el Muladar de Cincorres. (A) jaula-trampa construida ad hoc para buitres con cierre activado por control remoto. (B) Detalle de las canales de cerdo colocadas en la trampa para atraer a los buitres (flechas blancas). (C) Detalles de los buitres capturados.

Durante cada muestreo, la edad de los animales se determinó de acuerdo a las características del plumaje y el color del pico y el ojo. Los ejemplares adultos son de color pardo grisáceo, con las partes dorsales algo más pálidas, que contrastan con las plumas remeras oscuras, mientras que las ventrales son pardas y pueden aparecer algo listadas de tonos más claros, tienen el pico de color hueso, la gola blanca y algodonosa, el plumón de la cabeza claro y el iris de color amarillento o ambarino. Los juveniles, por su parte, son de color marrón rojizo, más oscuro que en los adultos, y poseen un plumaje compuesto por plumas lanceoladas con finas estrías claras, que son renovadas progresivamente por otras de perfil redondeado lucen una gola muy patente y desflecada, compuesta por largas plumas lanceoladas

de color rojizo, y tienen el iris y el pico negros. A medida que los ejemplares crecen, pasan por características intermedias hasta acabar adquiriendo el aspecto de un adulto a los 7 u 8 años (Calleja *et al.*, 2008). En base a estos criterios se clasificaron como juveniles (menos de 2 años), subadulto (entre 2 a 5 años) y adultos (más de 5 años).

El primero de los muestreos, utilizado para el estudio de salmonelosis y campilobacteriosis, se realizó en un total de 97 buitres leonados, capturados durante los meses de septiembre y octubre de 2013. De cada ejemplar se tomaron dos muestras cloacales usando hisopos estériles (Cary Blair estéril escobillones, DELTALAB). Se introdujeron los hisopos estériles 1 o 2 cm dentro de la cloaca para recoger una muestra adecuada. Cada muestra se analizó para el aislamiento de *Campylobacter* spp. y de *Salmonella* spp.

Además, y al tratarse del primer muestreo bacteriológico de la colonia de buitres en estudio, se recogieron muestras de sangre de la vena braquial (aproximadamente 5 mL) y se transfirió a tubos de análisis con 200 μ L de solución salina pre-refrigerado y se almacenaron a 0-4°C para la determinación del hematocrito, medido usando tubos capilares micro-hematocrito heparinizados, centrifugados durante 5 min a 10 000 rpm y leído en una tabla de lectura para tubos micro-hematocrito. Todo ello, al objeto de determinar el bienestar general de la colonia.

Una segunda captura, realizada en el año 2016, permitió obtener muestras de 71 animales orientadas al estudio de las micoplasmosis en la población. Se recogió una muestra de tráquea (n=71) y una muestra de cloaca (n=71), para un total de 142 muestras. Estas muestras se tomaron también con hisopos estériles (Cary Blair estéril escobillones, DELTALAB), los cuales se inocularon en 2 mL medio líquido SP4 (Whitcomb, 1983) cuya composición se describe en el Anexo 1, para su traslado al laboratorio, donde se incubaron durante 24h a 37°. Posteriormente, 24 horas más tarde, fueron filtrados a través de 0.45 μ m de diámetro, inoculándose el filtrado en 2 mL de medio fresco, incubándose en las mismas condiciones durante al menos 15 días. Las muestras en las que se observó crecimiento, fueron inoculadas en medio SP4 sólido (Anexo 1) (Whitcomb, 1983), con 0,2 mL de cada cultivo líquido, incubándose las placas en cámara húmeda, a 37°C durante al menos 15 días antes,

de considerarlas negativas. Todos los aislamientos fueron conservados mediante congelación (con una proporción 1:0.15 de solución protectora de glicerol), a -20°C .

4.1.2. Análisis microbiológico de las muestras.

4.1.2.1. Detección de *Campylobacter* spp.

El cultivo bacteriológico fue realizado de acuerdo con Norma ISO 10272-1: 2006 (Anexo E) (Figura 9) para la detección de *Campylobacter* spp. Los hisopos cloacales recogidos se analizaron por dos vías, por un lado cultivo directo y por otro con el paso previo de preenriquecimiento. Para el cultivo directo, los hisopos cloacales se sembraron directamente sobre dos placas de agar selectivo, una con agar modificado charcoal-cefoperazone-deoxycholate (mCCDA) y otra con agar Preston (laboratorios AES, Bruz Cedex, Francia) y se incubaron a $41.5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 44 ± 4 horas en atmosfera microaeróbica (84% N_2 , 10% CO_2 , 6% O_2) (CampyGen, Oxoid).

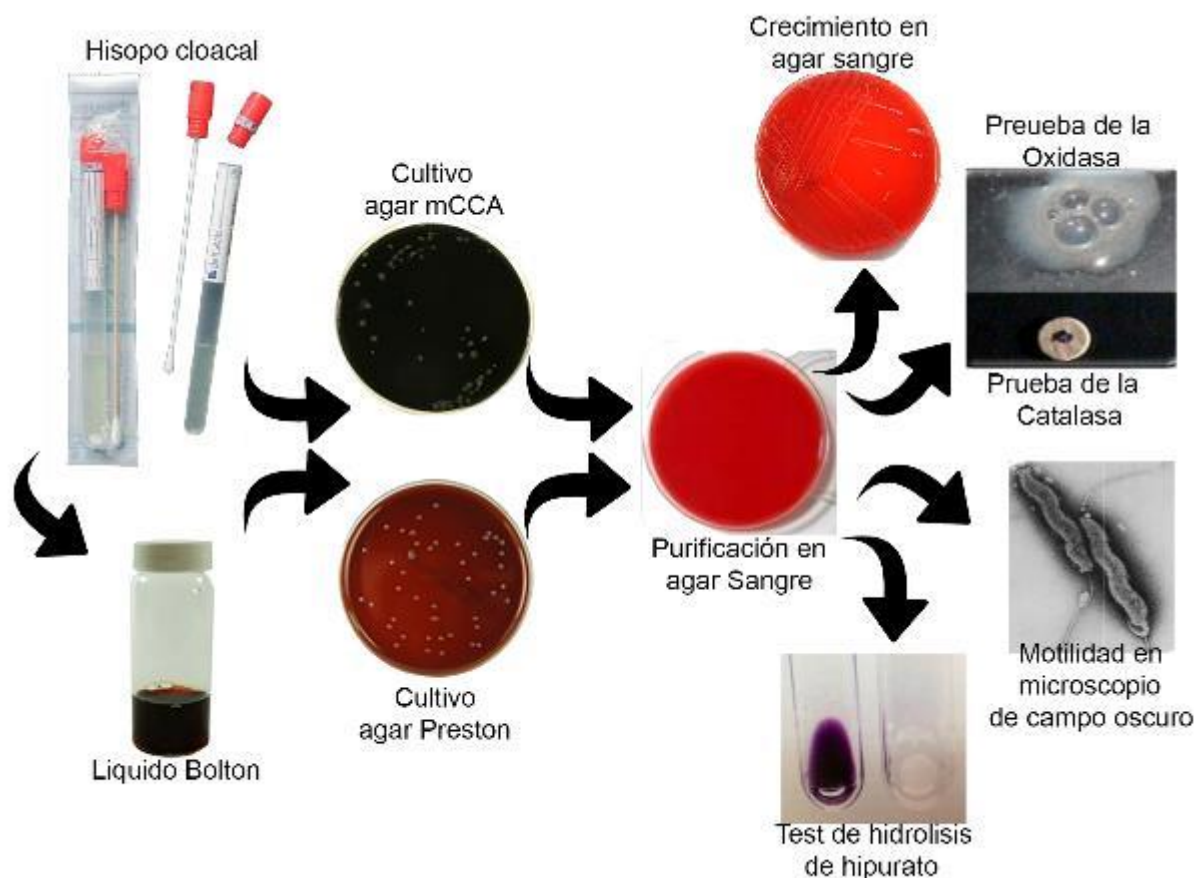


Figura 9. ISO 10272-2:2006 (Anexo E). Esquema para la detección de *Campylobacter* spp.

Posteriormente, los hisopos fueron pre-enriquecidos en 01:10 vol/vol líquido Bolton (Oxoid, Dardilly, Francia) y luego pre-incubado a $37\pm 1^\circ\text{C}$ durante 5 ± 1 horas. A continuación, el líquido de pre-enriquecido se incubó a $41.5\pm 1^\circ\text{C}$ durante 43 ± 1 horas. Una vez pasado el periodo de incubación, $10\ \mu\text{L}$ de la muestra se sembraron en las dos placas de agar selectivo (mCCDA y agar Preston) y se incubaron como se ha descrito anteriormente. Las colonias sospechosas a *Campylobacter* spp. presentaban un color grisáceo, acuoso y con tendencia a dispersarse por el medio agar. Dichas colonias sospechosas, se purificaron en agar sangre (AES Laboratories®, Bruz Cedex, France) y se confirmaron mediante las pruebas de crecimiento en agar sangre a diferentes temperaturas y atmósferas, prueba de la oxidasa, de la catalasa y motilidad en microscopio de campo oscuro. Finalmente, las especies se determinaron mediante procedimientos estándar que comprenden test de hidrólisis del hipurato.

4.1.2.2. Detección de *Salmonella* spp.

El procedimiento se basa en la norma ISO 6579:2002 (Anexo D) (Figura 10). Las muestras fueron pre-enriquecidas en 1:10 vol/vol de agua de peptona tamponada al 2,5% (BPW, Scharlau®, Barcelona, España) y luego se incubaron a $37\pm 1^\circ\text{C}$ durante 18 ± 2 horas. Las muestras pre-enriquecidas se transfirieron a placas de agar Rappaport-Vassiliadis semi-semisólido modificado (MSRV, Difco®, Valencia, España) y se incubaron a $41.5\pm 1^\circ\text{C}$ durante 24-48 horas. Tras la incubación, las placas sospechosas de ser positivas a *Salmonella* spp., presentaban halos blanquecinos alrededor del punto de inoculación del caldo pre-enriquecido. El cultivo obtenido en el MSRV fue inoculado en agar xilosa-lisina-desoxicholate (XLD, Liofilchem®, Valencia, España) y ASAP (Biokar Diagnóstico, Pantin Cedex, Francia) y se incubaron a $37\pm 1^\circ\text{C}$ durante 24-48 horas. Las colonias sospechosas en XLD presentaban una forma redondeada, coloración negra y envueltas en un halo transparente. Mientras que las colonias sospechosas en ASAP, presentaban una coloración malva. Tras el periodo de incubación, se sembraron 5 colonias típicas de *Salmonella* spp. en agar nutritivo (Scharlab®, Barcelona, España) y se incubaron durante 24 ± 3 horas a $37\pm 1^\circ\text{C}$. Finalmente, para la confirmación del género, se realizó una prueba bioquímica usando API (API-20®, bioMérieux, Madrid, España).

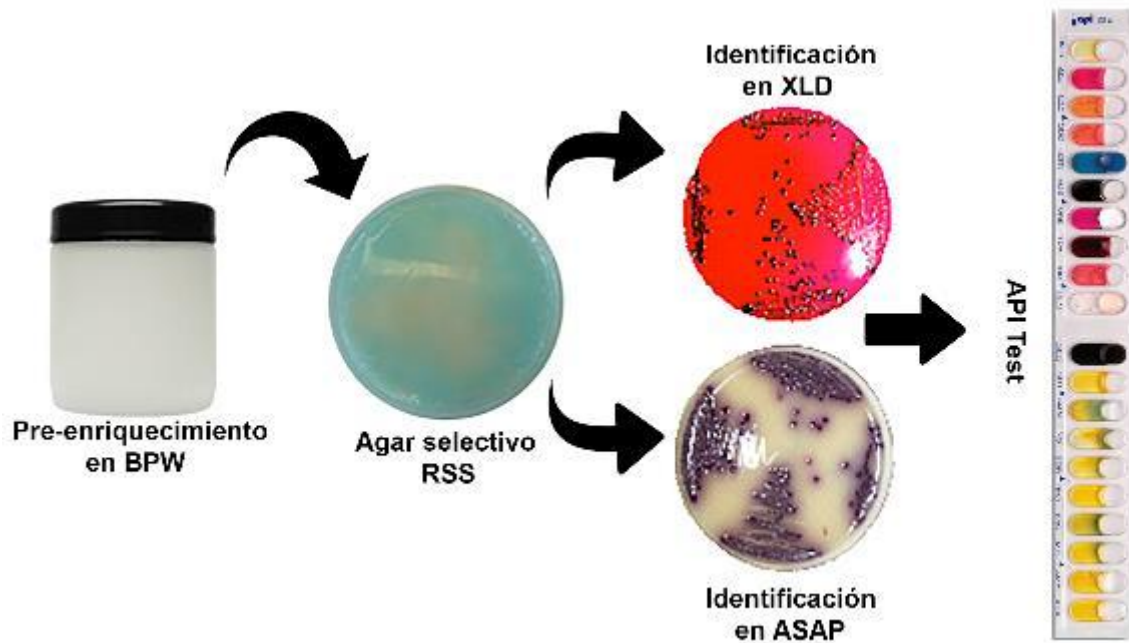


Figura 10. ISO 6579:2002 (Anexo D). Esquema para la detección de *Salmonella* spp; **BWP:** Agua de Peptona Tamponada; **MSRV:** *Modified Semisolid; Rappaport-Vassiliadis*; **XLD:** agar Xlose-Lysine-Desoxicolate; **ASAP:** agar cromogénico para la detección de *Salmonella* spp.

Para la determinación del serotipo, las cepas de *Salmonella* spp. confirmadas fueron serotipadas por el Laboratorio Central de Veterinaria (LCV) Algete (Madrid) del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, mediante la técnica Kauffman-White-Le Minor (Issenhuth-Jeanjean *et al.*, 2014). Según esta técnica, cada cepa tiene que ser mezclada con antisueros polivalentes y monovalentes hasta que se determina la fórmula antigénica. Una gota de antisuero tiene que ser mezclada con la cepa en movimientos circulares. La reacción se considera negativa si no se observa aglutinación.

4.1.2.3. Detección de *Mycoplasma* spp.

4.1.2.3.1. Pruebas preliminares.

En primer lugar, las muestras se filtraron por filtros con un tamaño de poro de 0.22 μm , ya que los micoplasmas consiguen atravesar este diámetro. Posteriormente, y para descartar la presencia de formas L bacterianas, se realizaron las pruebas de reversibilidad, mediante pases sucesivos en medio sin antibióticos.

Por último, se procedió al clonaje, realizándose sucesivas diluciones de los cultivos positivos, y sembrándose en medio sólido para poder conseguir colonias bien separadas, que fueron extraídas con la ayuda de pipetas Pasteur estériles, y sembradas de nuevo en medio líquido, repitiéndose este proceso al menos tres veces, siguiendo la metodología estándar de cultivo de estos microorganismos.

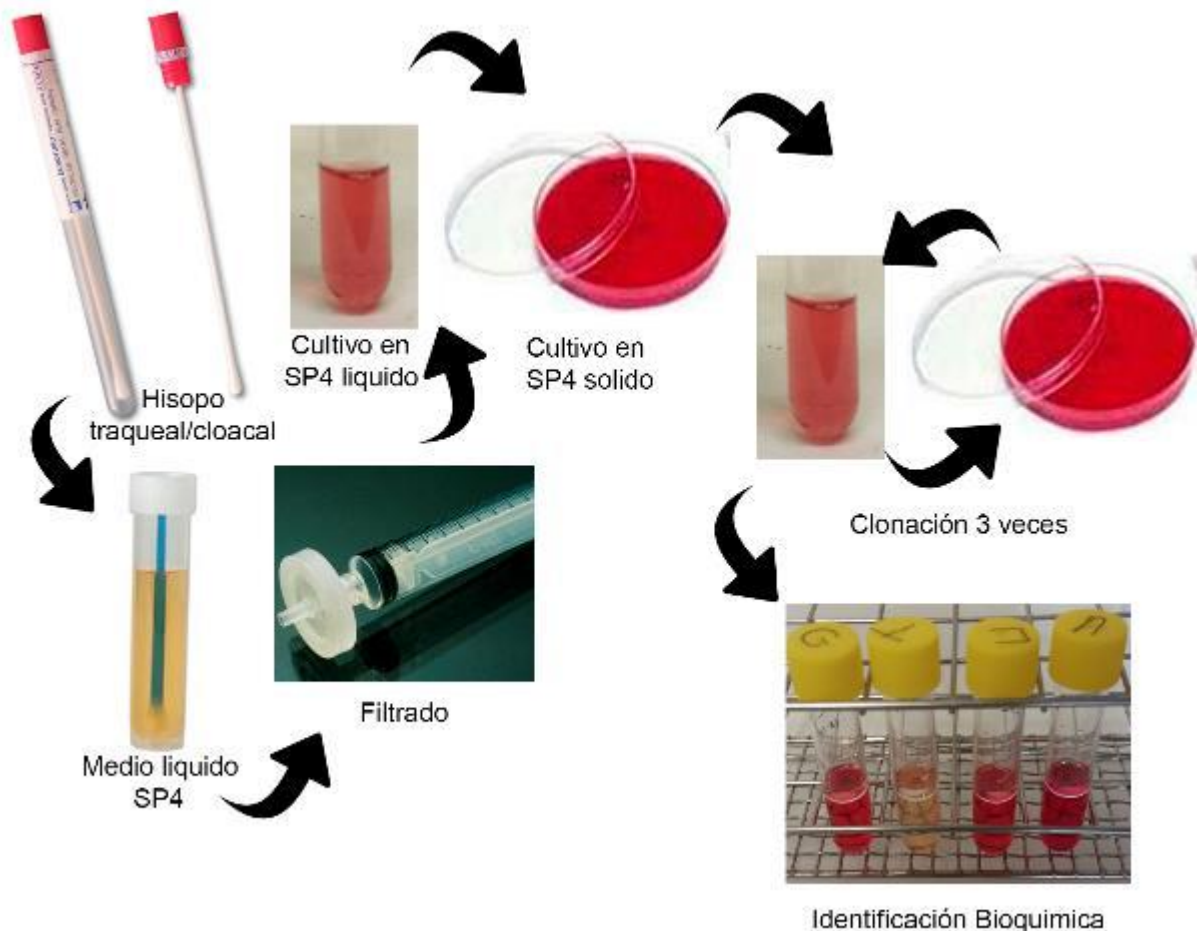


Figura 11. Esquema para la detección de *Mycoplasma* spp.

Los cultivos positivos se identificaron bioquímicamente de modo preliminar y molecularmente (por PCR) a posteriori.

4.1.2.3.2. Identificación bioquímica.

4.1.2.3.2.1. Medios de Bioquímica.

La composición de los medios y los protocolos empleados en la identificación bioquímica, se basan en la descripción realizada por (Poveda, 1998).

Todos los componentes de los medios para la identificación bioquímica se esterilizaron antes de mezclarse, conservándose a -20°C hasta su uso. Las soluciones de HIB (Heart infusion broth) e HIA (Heart infusion agar) se esterilizaron en autoclave y el resto por filtración (a través de $0.22\ \mu\text{m}$). La solución del extracto de levadura fue calentada en un baño térmico, a 60°C durante una hora, para inactivar la actividad fosfatásica del extracto de levadura. El suero de caballo se comercializa estéril y antes de su uso, y después de descongelarse, es calentado a 56°C durante 30 minutos para la inactivación del complemento. Finalmente, los medios fueron distribuidos en tubos de plástico estériles, a razón de 2 mL por tubo y conservados a -20°C hasta su uso.

4.1.2.3.2.2. Protocolos.

4.1.2.3.2.2.1. Fermentación de la glucosa.

Para las pruebas de fermentación de la glucosa, se inocularon los tubos con 2 mL del medio descrito en el Anexo 1, con 200 μL del cultivo fresco del microorganismo a identificar, agregando 0.5 mL de parafina líquida estéril para conseguir un ambiente anaerobio. Los tubos se incubaron a la temperatura adecuada (37°C), junto a un control negativo.

Se consideraron positivas cuando se produjo un descenso del pH del medio de al menos media unidad de pH, momento en el cual, el color del medio cambiaría hacia amarillo.

Transcurridos 15 días sin cambio aparente del color, y por tanto del pH del medio, las pruebas fueron consideradas negativas.

4.1.2.3.2.2.2. Hidrólisis de la urea.

Para esta prueba, que sirve para diferenciar los ureaplasmas del resto de los *Mollicutes*, también se inocularon 200 μL de cultivo de todas las cepas a identificar en tubos con 2 mL del medio descrito en Anexo 1, añadiéndose de igual modo 0.5 mL de parafina líquida estéril e incubándose a 37°C .

Con la actividad ureásica, el pH aumentaría al menos 0.5, por lo que el color del indicador de pH (rojo fenol) viraría hacia rojo-violeta, considerándose la prueba negativa una vez transcurridas dos semanas.

4.1.2.3.2.2.3. Hidrólisis de la arginina.

Con esta prueba se pretendió detectar la actividad de la arginina dehidrolasa de los micoplasmas y para ello, se inoculó la misma cantidad de cultivo que en las pruebas anteriores, 200 μ l, colocando los tubos con 2 mL del medio descrito en el Anexo 1, en anaerobiosis a 37°C durante 15 días.

Si el medio se alcalinizaba, la prueba se consideraba positiva, mientras que si el indicador de pH no viraba a rojo violáceo, la prueba se consideraba negativa.

4.1.2.3.2.2.4. Reducción del trifenil tetrazolium.

Para demostrar la capacidad de reducción del 2-3-5- trifenil tetrazolium de las cepas estudiadas, se inocularon tubos con 2 mL del medio descrito en Anexo 1, por duplicado, uno en anaerobiosis con parafina líquida estéril, y otro en aerobiosis. Como control negativo se utilizó medio sin inocular. Todos los tubos se incubaron a 37°C hasta 15 días. En los casos positivos se detectó un precipitado rojo en el fondo del tubo.

4.1.2.3.2.2.5. Producción de películas y cristales.

Con la realización de esta prueba se pone de manifiesto la presencia o ausencia de actividad lipolítica. Para ello, se inocularon placas de medio sólido SP4 con un 20% de suero, a las que previamente se les eliminó la humedad superficial (a 37°C, 30 minutos), incubándose en atmósfera húmeda a 37°C.

Con la ayuda de un microscopio óptico y con el objetivo de 4X aumentos, se observó la formación de cristales (precipitados de Ca y Mg) alrededor de las colonias. La presencia de película se reveló el último día de incubación. Al inundar la placa con agua destilada, se debería desprender una fina capa de lípidos que quedaría

flotando. Ambos efectos siempre aparecen juntos, ya que son el resultado de la acción de una lipasa.

4.1.2.3.3. Identificación molecular.

Para la identificación molecular de las cepas de *Mycoplasma* spp. aisladas se realizó en primer lugar una PCR para determinar la presencia de *Mycoplasma* spp. (Van Kuppeveld *et al.*, 1994). Donde se obtuvo un resultado positivo, se realizó una segunda PCR diseñada en base al gen 16SARNr (Pettersson *et al.*, 1996), procediendo posteriormente a la secuenciación y estudio del producto.

Como paso previo a la realización de la técnica de PCR, se realizaron las correspondientes extracciones del ADN genómico a partir de una alícuota del cultivo en medio líquido de las muestras, utilizando el método desarrollado por Tola *et al.*, (1997)..

4.1.2.3.3.1. Extracción de ADN.

El método desarrollado por Tola *et al.*, (1997), está fundamentado en el uso de una matriz de sílice y de las sales caotrópicas (tiocinato de guanidina). En el Anexo 1, se describe de forma pormenorizada los reactivos y el método utilizado para la extracción de ADN, cuyo Protocolo de extracción de ADN es el siguiente (Tola *et al.*, 1997).

- Se depositaron 200 µL de cultivo en un ependorf y se le añadieron 100 µl de solución denaturante, homogeneizando la muestra mediante un ligero movimiento durante 10 minutos.
- A continuación, se le añadió a cada muestra 900 µl de tampón de lisis y 40 µl de sílice, homogeneizando la misma constantemente durante 10 minutos.
- Transcurrido ese tiempo, se homogeneizaron en el vórtex y se centrifugaron durante 15 segundos a 14.000 rpm.

- Una vez centrifugado se decantó el sobrenadante y se añadió 500 µl de solución de lavado a cada muestra, para posteriormente ser homogeneizada en el vórtex y de nuevo centrifugadas durante 15 segundos a 14.000 rpm. De nuevo se decantó el sobrenadante y se añadieron 500 µl de solución de lavado.
- Después de homogeneizarse durante unos segundos en el vórtex y centrifugarse a 14.000 rpm durante 15 segundos, se decantó el sobrenadante y se añadió a cada muestra 500 µl de etanol al 70 %. A continuación, se homogeneizaron durante unos segundos y se centrifugaron a 14.000 rpm. Tras decantar el sobrenadante, se volvieron a añadir 500 µl de etanol al 70 % para volver a homogeneizar y centrifugar en las mismas condiciones.
- Tras retirar el sobrenadante, se añadieron 500µl de acetona a cada muestra para posteriormente ser homogeneizadas durante unos segundos en el vórtex y centrifugadas a 14.000 rpm durante 15 segundos.
- Decantado el sobrenadante, se llevó a cabo el secado del pellet, manteniendo el eppendorf durante 10 minutos a 56 °C en un calentador para eppendorfs con la tapa abierta.
- Tras los 10 minutos, se añadieron 100 µl de TE buffer (pH 5) y se homogeneizaron unos segundos en el vórtex. Tras volver a calentar los eppendorfs durante 10 minutos a 56 °C con la tapa cerrada, se homogeneizaron y centrifugaron a 14.000 rpm durante 2,5 minutos.
- Finalmente, el ADN extraído quedó en el sobrenadante y se conservó a – 20°C hasta su posterior análisis.

4.1.2.3.3.2. PCR para detectar *Mycoplasma* spp.

PCR específica para la detección de microorganismos pertenecientes al género Mollicutes, cuyos cebadores fueron diseñados por Van Kuppeveld *et al.*, 1994 (Tabla 5). Como control positivo se utilizó el ADN purificado de la cepa de referencia de *Mycoplasma bovis* (PG45). A continuación, se detallan las condiciones de

amplificación. Los cebadores utilizados fueron elaborados por Sygma-Genosys (Reino Unido).

Tabla 5: Cebadores específicos para la detección de *Mycoplasma spp.*

Cebadores	
5'-GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT-3'	P1
5'-TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC-3'	P2

Para la realización de la PCR, se partió de 8 µl de producto final de la extracción de ADN, utilizando como control positivo ADN purificado de la cepa pg45 de *M. bovis*. La composición de la mezcla utilizada se describe en el Anexo 1.

El proceso de amplificación se realizó en un termociclador modelo "i-cicler" (Bio Rad). En el anexo 1 se detallan pormenorizadamente las condiciones de la misma.

Los productos resultantes de la PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Como marcador molecular se utilizó el Marcador XIV (Roche Diagnostics). Finalmente, los productos se visualizaron por tinción con bromuro de etidio en un equipo de análisis de imagen (Syngene, Cambridge, UK)

4.1.2.3.3.3. Secuenciación del gen 16sARNr.

PCR específica para la detección de microorganismos pertenecientes al género Mollicutes, cuyos cebadores fueron diseñados por Pettersson *et al.*, 1996. (Tabla 6) Como control positivo se utilizó el ADN purificado de la cepa de referencia de *M. bovis* (PG45). A continuación se detallan las condiciones de amplificación. Los cebadores utilizados fueron elaborados por Sygma-Genosys (Reino Unido).

Tabla 6: Cebadores específicos para estudiar la secuencia del gen 16sARNr en Mollicutes.

Cebadores	
5'-GTTTGATCCTGGCTCAGGAYDAACG-3'	U1
5'-GAAAGGAGGTRWTCCAYCCSCAC-3'	U8

Para la realización de la PCR, se partió de 8µl de producto final de la extracción de ADN, utilizando como control positivo ADN purificado de la cepa pg45 de *M. bovis*. La composición de la mezcla utilizada se describe en el Anexo 1.

El proceso de amplificación se realizó en un termociclador modelo “i-cicler” (Bio Rad). En el anexo 1 se detallan pormenorizadamente las condiciones de la misma.

Los productos resultantes de la PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1%. Como marcador molecular se utilizó el Marcador XIV (Roche Diagnostics). Finalmente, los productos se visualizaron por tinción con bromuro de etidio en un equipo de análisis de imagen (Syngene, Cambridge, UK). En los casos en los que se observó amplificación, se procedió a secuenciar el producto en el Servicio de Biología Molecular del SAI (Servicio de apoyo a la investigación de la Universidad de Murcia). Las secuencias se alinearon mediante el programa MEGA6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0) (Tamura *et al.*, 2013) y posteriormente, se realizó la comparación de la secuencia de los aislamientos con la información disponible en las bases de datos a nivel internacional utilizando la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine, USA) (Altschul *et al.*, 1990).

4.1.3. Análisis estadístico.

Para el estudio de la presencia de *Salmonella* por edades, utilizamos un Modelo Lineal Generalizado (en sus siglas en inglés GLM) para comparar la masa corporal y el hematocrito de las distintas edades de los individuos (juvenil, subadulto y adulto). Un GLM, que supone una distribución binomial para los datos obtenidos para *Salmonella* spp. y determinar si existe un efecto de la edad de los buitres. Un valor de P menor de 0,05 fue considerado indicador de una diferencia estadísticamente significativa. Los datos se presentaron como mínimos cuadrados medios \pm el error estándar de los mínimos cuadrados medios. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo utilizando un programa disponible comercialmente (Software SPSS 16,0; SPSS Inc., Chicago, Illinois, EE.UU., 2002) (Norusis, 2008).

4.2. Experimento 2. Fuentes de infección de *Salmonella* spp. del buitre leonado.

En el segundo experimento, realizado durante dos sesiones comprendidas entre los meses de septiembre y octubre de 2015, se capturaron un total de 104 buitres

leonados para la determinación de la presencia de *Salmonella* spp. en cloaca. Estas muestras se tomaron con hisopos estériles con medio de transporte (Cary Blair sterile transport swabs, DETALAB).

Además, se recogieron muestras que provenían de diferentes superficies que entran en contacto con los cadáveres de los cerdos que proveen al muladar para la alimentación de los buitres. Dicha toma de muestras se realizó durante el almacenamiento y transporte al muladar de los cadáveres. Para ello, se tomaron muestras del vehículo de transporte de los cadáveres ($n=30$), muestras de las casetas de depósito de cadáveres ($n=30$) y, por último, muestras de la propia superficie de los cadáveres de los cerdos con las que se alimentaban a los buitres, en el mismo muladar ($n=20$). Todas ellas se recogieron con hisopos estériles con medio de transporte (Cary Blair sterile transport swabs, DETALAB) (Figura 11).

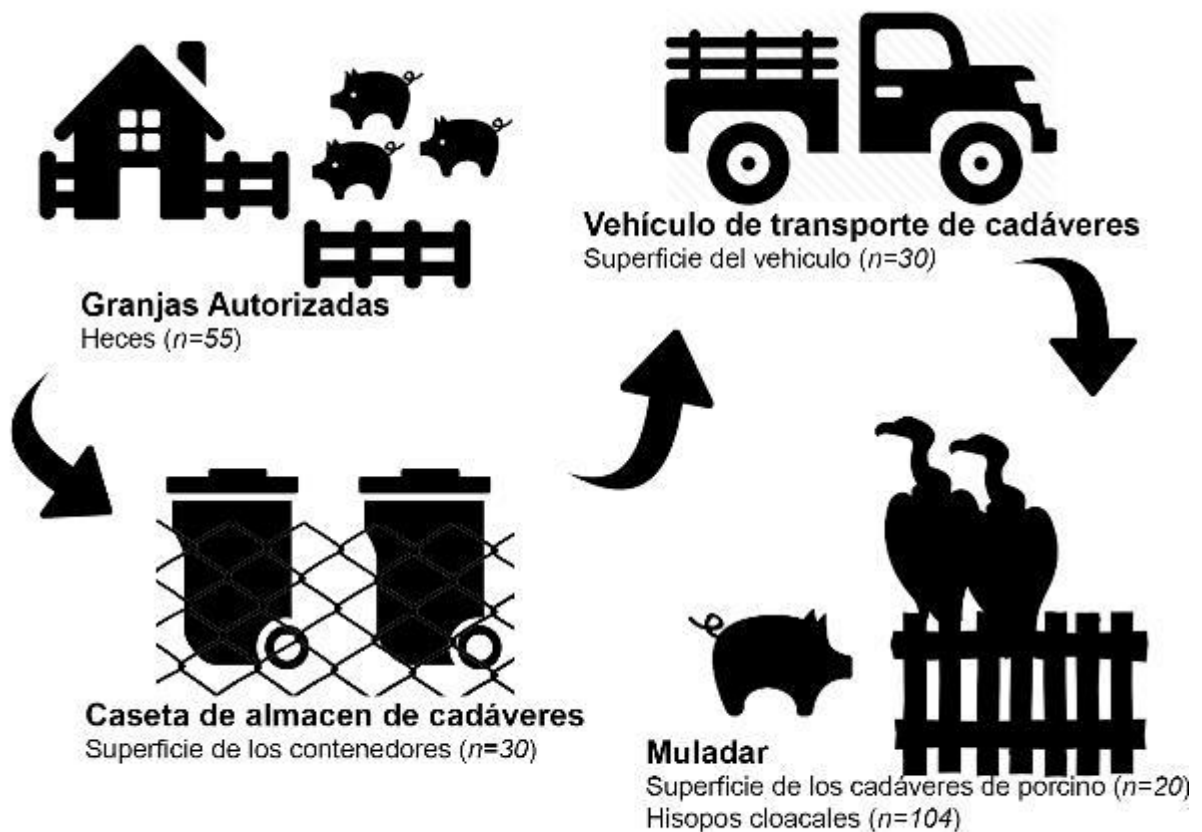


Figura 12. Esquema de plan de muestreo durante las sesiones de septiembre y octubre de 2015.

Finalmente, se muestrearon todas las granjas de cerdos autorizadas (n=11), del término municipal de Cintorres, de las cuales provenían los cadáveres que se aportaban al muladar, para alimentar a los buitres. Todas las granjas de porcino están incluidas en el Registro de Explotaciones Ganaderas de la CV con diferente clasificación zootécnica (4 de ciclo cerrado, 6 cebaderos y una mixta). Por cada granja se recogieron, 5 muestras de heces de 500 gramos de las naves donde se albergaban los cerdos en su última fase de engorde, las muestras se recogieron aleatoriamente en 5 puntos distintos de las naves. Estas muestras, se introdujeron en recipientes estériles de 500 mL (DETALAB, Barcelona, España) y se transportaron hasta el laboratorio bajo condiciones de refrigeración. Finalmente, se analizaron dentro de las 24 horas tras su recogida.

En total, durante este experimento, se recogieron un total de 239 muestras, de las cuales, 104 provenían de las cloacas de los buitres.

4.2.1. Análisis microbiológico. Detección de *Salmonella* spp.

El aislamiento de *Salmonella* spp. se realizó siguiendo la norma ISO 6579:2002 recomendaciones (Anexo D), tal y como se ha explicado anteriormente.

4.2.2. Estudio filogenético de las cepas.

Las cepas aisladas, se genotiparon por la presencia de secuencias consenso repetitivas intragénicas de enterobacterias (secuencias ERIC) en reacción en cadena de la polimerasa (ERIC-PCR; en sus siglas inglesas). Los «primers» utilizados fueron ERIC-1R y ERIC-2R (Versalovic *et al.*, 1991)(Tabla 7).

Tabla 7: Cebadores específicos para estudiar la secuencia del gen 16sARNr en Salmonellas.

5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3'	1R
5'-AAGTAAGTACTGGGGTGAGCG-3'	2R

La similitud de las matrices se calculó utilizando el coeficiente de *Dice* y los patrones obtenidos se analizaron con el programa Fingerprinting II v 3.0 software (Bio-Rad,

Hercules, CA, USA) (Sulston *et al.*, 1988). La clasificación de las cepas que tenían un mayor perfil genético idéntico se analizó con el método UPGMA («unweighted-pair group method with arithmetic mean»). Aquellas que presentaban un 90% de similitud entre ellas se consideraron idénticas o similares.

4.2.3. Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico se utilizó un modelo lineal generalizado con una distribución binomial. La prevalencia de *Salmonella* spp. entre los distintos tipos de muestra fue descrito por la función del enlace *logit*. Para este análisis, el error estimado se designó como una distribución binomial y se utilizó la función del enlace *probit*. Los datos binomiales para cada muestra se asignaron, como 1 si *Salmonella* spp. estaba presente en las muestras y 0 si la bacteria estaba ausente. Las diferencias significativas entre las medias se determinaron a partir de un valor de $P \leq 0.005$. El análisis estadístico se realizó utilizando el programa SPSS Statistics versión 21.0 (SPSS 21.0 software package; SPSS Inc., Chicago, IL, 2002).

5. RESULTADOS y DISCUSIÓN.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1. Experimento 1. Presencia de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. y *Mycoplasma* spp. en el buitre leonado.

5.1.1. Estado sanitario de la población en estudio.

Los resultados del hematocrito de la población muestreada se muestran en la tabla 8. No se encontraron diferencias significativas en la masa corporal y el valor hematocrito en función de la edad de los ejemplares. Los valores de hematocrito obtenidos fueron similares a los descritos previamente en la literatura para el buitre leonado (Ferrer *et al.*, 1987). Para valorar sanitariamente a los ejemplares muestreados en este experimento, se ha tenido en cuenta el valor hematocrito, (porcentaje de glóbulos rojos en sangre) que es un indicador útil del estado general de salud de las aves rapaces (Cooper, 1975; Hawkey *et al.*, 1985). Este valor, así como otros parámetros sanguíneos, varía en aves rapaces según su estado de nutrición, disminuyendo en el caso de animales malnutridos o enfermos. Por tanto, todos los buitres leonados muestreados en este estudio eran animales de vida libre, sanos, de acuerdo con el nivel de hematocrito y la masa corporal.

Tabla 8. Masa corporal y hematocrito en buitres leonados silvestres en función de la edad.

EDAD	n	Masa Corporal (g) ± ES	Hematocrito % ± ES
Juvenil	5	8.508±76	45,2±0,4
Subadulto	11	8.2050±200	45,8±1,0
Adulto	81	7.498±297	46,8±1,5
Todos	97	8.447±70	45,4±0,4

n: número de aves analizadas. g: gramos. **Hematocrito (%)**: porcentaje de glóbulos rojos en sangre. **ES**: error estándar.

5.1.2. Presencia de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. y *Mycoplasma* spp. en el buitre leonado.

En referencia a la presencia de *Campylobacter* spp., este microorganismo fue aislado en 1 sólo de los 97 (1,0%) buitres leonados muestreados. Dicho aislamiento fue identificado como *C. jejuni*. Las heces de aves silvestres en el medio natural han sido identificadas como un reservorio importante de *Campylobacter* spp.

(Waldenström *et al.*, 2010). En nuestro estudio, *C. jejuni* fue identificado en el buitre leonado, de acuerdo con otros autores (Molina-Lopez *et al.*, 2011) y se corresponde con lo observado en otras especies de aves silvestres como anseriformes de vida libre, aves acuáticas migratorias, córvidos y falconiformes (Yogasundram *et al.*, 1989; Keller *et al.*, 2011). No obstante, los resultados obtenidos muestran una frecuencia de aislamientos de *C. jejuni* inferior al encontrado en otras especies de aves de vida libre. En nuestro estudio se aisló *C. jejuni* en un animal de 97 estudiados frente a prevalencias del 12.9% en anseriformes de vida libre, 7.7% en falconiformes encontradas por Yogasundram *et al.*, en 1989 en Luisiana, o los resultados obtenidos por Keller *et al.*, en 2011 en la región del Atlántico medio en EEUU, con prevalencias del 5% en Ánade real (*Anas platyrhynchos*), el 33% en gaviota reidora (*Larus atricilla*), el 3% en Mirlo primavera (*Turdus migratorius*), entre el 17% y el 40% en varias especies de córvidos o el 13% en el ratonero de cola roja (*Buteo jamaicensis*), que como el buitre leonado, pertenece a la familia Accipitridae.

En estudios realizados en la primera década de este siglo, Griekspoor *et al.*, en 2013, demostraron que *C. jejuni* aislado en aves silvestres es, en general, distinto del aislado en campilobacteriosis humana y en alimentos para animales. Los distintos genotipos de *C. jejuni* hallados en el estudio de Griekspoor *et al.*, en 2013, dependían de la especie de ave silvestre de la que se aislaron, siendo su origen geográfico de poca importancia. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que los buitres leonados silvestres pueden ser hospedadores de este género bacteriano pero su frecuencia de aislamiento sugiere que probablemente tenga poca importancia relativa en la epidemiología de la campilobacteriosis humana. Para comprobar esto, serán necesarios futuros estudios, para evaluar los genotipos de los aislamientos de *Campylobacter* spp. en buitre leonado silvestre y su relación con los aislados en campilobacteriosis humana.

Por otra parte, en referencia al género *Salmonella* spp. se aisló en 51 de los 97 (52,6%) buitres de la muestra. No se encontraron diferencias significativas entre la edad de los individuos y la presencia de *Salmonella* spp. (Tabla 9).

Tabla 9. Porcentaje de ejemplares de buitre leonado *Salmonella*-positivo por edades.

EDAD	n	<i>Salmonella</i> spp. (%)
Juvenil	5	80
Subadulto	11	54,5
Adulto	81	50,6
Todos	97	52,6

La edad de los animales se determinó de acuerdo con las características del plumaje, el color del pico y el ojo (**juvenil**, menos de 2 años; **subadulto**, entre 2-5 años; **adulto**, más de 5 años). n: número de aves analizadas.

La serotipificación reveló 6 serovariantes diferentes de dos subespecies de *Salmonella entérica* (Tabla 10); *S. entérica* subsp. *entérica* (n = 49, 96,1%) y *S. entérica* subsp. *salamae* (n = 2, 3,9%). No se aisló más de una serovariante por individuo. Los serotipos aislados fueron *S. Typhimurium* (n = 42, 82,3%), *S. Rissen* (n = 4, 7,8%), *S. Senftenberg* (n = 3, 5,9%) y *S. 4,12: b [-]* (n = 2, 3,9%).

Tabla 10. Serovariantes de *Salmonella* spp. aisladas en buitres leonados.

Subespecies	Serovariante	n
<i>entérica</i>	Monophasic Typhimurium 4,5,12:i: -	40
<i>entérica</i>	Rissen 6,7: f,g: -	4
<i>entérica</i>	Senftenberg 1,3,19: g,s,t: -	3
<i>salamae</i>	4,12:b: -	2
<i>entérica</i>	Monophasic Typhimurium 4,12:i: -	1
<i>entérica</i>	Typhimurium 4,12:i: 1,2	1

n: n° de cepas aisladas

En este estudio, el 82,3% de los aislamientos fueron de *S. Typhimurium*, un serotipo de especial importancia para la salud pública. Este es, junto con *S. Enteritidis*, uno de los serotipos más frecuentemente involucrado en la salmonelosis humana (CDC, 2008; EFSA, 2016). *Salmonella Typhimurium* ha sido previamente descrito en el buitre leonado (Millan *et al.*, 2004; Molina-Lopez *et al.*, 2011) y se consideró el serotipo más común que se encuentra en las aves silvestres (Hatch, 1996; Hernandez *et al.*, 2003).

Durante muchos años los buitres leonados han contribuido a la eliminación de los cadáveres de los animales muertos en explotación, sobre todo en explotaciones de tipo extensivo, generalmente de rumiantes, tanto de bovino como de ovino-caprino,

lo que suponía un método de eliminación seguro y económico, si bien, en los últimos años, el buitre leonado casi exclusivamente, se ha alimentado de canales porcinas (Camiña y Montelío, 2006; Martínez-Abraín *et al.*, 2012), por lo motivos ya expuestos. *S. Typhimurium* es el serotipo más frecuentemente aislado en cerdos de producción (Arguello *et al.*, 2013; Denis *et al.*, 2013). A pesar de que anteriormente se ha postulado que las rapaces pueden haber adquirido la bacteria por la ingestión de pequeños paseriformes, ratones o palomas (Tauni y Osterlund, 2000; Millan *et al.*, 2004), nuestros resultados sugieren la posibilidad de que los buitres pueden estar infectados por las cepas adquiridas tras la ingestión de cadáveres de cerdo. En rapaces, se ha descrito que la *Salmonella* spp. puede ser indicador de una infección en otras poblaciones de animales (por ejemplo, pequeños mamíferos y paseriformes) (Kirkpatrick y Trexler-Myren, 1986; Keymer, 1972).

Los resultados de este experimento ponen de manifiesto que se debe tener en cuenta a los buitres leonados de vida libre como una fuente potencial de infección de este patógeno bacteriano, y el riesgo zoonótico que suponen para la población en general. Davies y Wales, (2013) demostraron en su estudio en Reino Unido que cereales utilizados para la alimentación animal pueden ser contaminados por *Salmonella* spp. en las explotaciones agrícolas de origen, debido a la acción de roedores y otros animales silvestres, que pueden ser ignorados en muestreos de rutina, y puede implicar a serovariantes de especial importancia para la salud pública, tales como *Salmonella* Typhimurium. En el estudio mencionado se aislaron dos tipos de *S. Typhimurium* en los cereales utilizados para la producción de piensos, los mismos tipos que fueron aislados en las superficies de los locales en las zonas de entrada y de carga de productos y en heces de aves silvestres. Se identificaron numerosos serotipos de *Salmonella* spp., incluyendo *S. Typhimurium*, en los cereales, en las áreas de almacenamiento y de manipulación de grano, y en muestras de animales silvestres. Ratones capturados de una granja de cerdos excretaron *Salmonella* Derby y *Salmonella* Bovismorbificans durante 10 meses después de su captura. Los principales problemas de la contaminación por *Salmonella* spp. de cereales, parece ser la ubicación de los almacenes de grano en las propias granjas de ganado, y el acceso al grano en estos almacenes de especies de fauna silvestre y animales domésticos.

S. Typhimurium y *S. Enteritidis* se han asociado con salmonelosis humana, pero otros serotipos aislados en este estudio, que se consideran raramente asociados con la enfermedad en humanos, en ocasiones también han participado en casos de salmonelosis humana. Por ejemplo, *S. Rissen*, que ha sido previamente descrita en el buitre leonado (Molina-Lopez *et al.*, 2011), es comúnmente aislada en cerdos y productos derivados del cerdo, mientras que rara vez se ha descrito aislada a partir de fuentes humanas (Astorga *et al.*, 2007), a excepción de Tailandia, donde en la pasada década, se observó un notable aumento de los casos de infección, donde *S. Rissen* fue el serotipo más comúnmente aislado en cerdos y en los trabajadores relacionados con el ganado porcino y el segundo en los trabajadores de granjas de pollos (Padungtod y Kaneene, 2006). En Dinamarca también ha sido aislado este serotipo en personas con y sin historial de viajes a Tailandia, también en ese país se aisló *S. Rissen* en cerdos, productos de cerdo, pavos y alimentos para animales. (Hendriksen *et al.*, 2008). Este serotipo junto a *S. Typhimurium* fueron los de mayor prevalencia de los 10 serotipos encontrados (30.7% cada uno), en un estudio realizado en ganado porcino de Andalucía por Astorga *et al.*, (2007). *S. Senftenberg* se ha aislado en aves silvestres en el norte de Inglaterra (Hughes *et al.*, 2008). Aunque *S. Senftenberg* no aparece entre los primeros 20 serotipos implicados en la salmonelosis humana en Estado Unidos (CDC, 2016) ni en Europa (EFSA, 2016), el organismo se detecta de forma rutinaria en los seres humanos y ha sido reconocido en los casos clínicos no humanos de la enfermedad (en el puesto 10 en 2006) y en fómites se ha encontrado en el puesto 4 (utensilios, recipientes, medio ambiente). Esta, parece ser una cepa emergente en las enfermedades humanas y animales por eso ha sido estudiada con más profundidad por otros autores (Stepan *et al.*, 2011). En 2007, el Laboratorio de Patógenos Entéricos de la Agencia de Protección de la Salud notificó 51 aislamientos de *Salmonella* Senftenberg en humanos en Inglaterra y Gales (Pezzoli *et al.*, 2007). En último lugar destacar que también se ha aislado la especie *Salmonella* subsp. *Salamae*, la cual no había sido descrita anteriormente en las aves silvestres. Se ha documentado en zorro rojo y reptiles por otros autores (Botti *et al.*, 2013; Marin *et al.*, 2013) y un caso de infección en humanos, asociado con el consumo de carne de reptiles (López *et al.*, 2012).

Como ya se ha indicado, *Campylobacter* spp. y *Salmonella* spp. son las zoonosis con mayor prevalencia en el mundo, y frente a las cuales, los gobiernos de muchos

países destinan gran cantidad de recursos para su control, siendo uno de los principales problemas en salud pública. Las fuentes de la infección humana son numerosas, aunque cabe destacar el consumo de carne de cerdo y vacuno, leche y productos lácteos en el caso de *Campylobacter* spp. y productos derivados de las aves como carne de pollo y huevos en el caso de la *Salmonella* spp. Sin embargo otras fuentes que también se han citado y que parecen tomar fuerza en los últimos años son las mascotas, como tortugas y otros reptiles (Lafuente *et al.*, 2013; Marin *et al.*, 2013), hámster y otros roedores (Swanson *et al.*, 2007), que viven con las personas, en acuarios y jaulas, que pueden ser reservorios de gérmenes zoonóticos como los que nos ocupan, y que en ocasiones son manipuladas por niños sin tener en cuenta el riesgo sanitario que suponen, y se ubican en lugares de las viviendas como las cocinas, donde la proximidad con los alimentos aumenta la posibilidad de contaminación de esto.

La presencia de *Salmonella* spp. y *Campylobacter* spp. en esta población controlada de buitre leonado silvestre es muy diferente, pues el porcentaje de *Salmonella* spp. detectado en los buitres leonados silvestres en ambos experimentos, fue del 52,6% en el experimento 1 y del 22,1% en experimento 2, mientras que el de *Campylobacter* spp. apenas llega al 1%. Estos resultados contrastan con los obtenidos en otros estudios, en los que el porcentaje de presencia de *Salmonella* spp. en buitres fue inferior al 10% (Reche *et al.*, 2003; Millan *et al.*, 2004; Molina-Lopez *et al.*, 2011). Una posible explicación de esta diferencia tan significativa en la presencia de *Salmonella* spp. puede deberse al bajo número de animales de esta especie que fueron examinados en estos estudios anteriores (n=12 Reche *et al.*, 2003; n=3 Millan *et al.*, 2004; n=9 Molina-Lopez *et al.*, 2011), frente al centenar, aproximadamente, de buitres que se analizó en cada uno de los experimentos de nuestro estudio.

Otra hipótesis que puede explicar estos resultados tan dispares, es que, en el momento del muestreo, la bacteria sí que estuviera presente en el animal, pero no fuera posible su detección, bien por el método de toma de muestras utilizado o por el tipo de muestra obtenida. Esto es debido a que la excreción de *Salmonella* spp. no se produce de manera continua en el tiempo sino que se produce de manera intermitente (Marin y Lainez, 2009). No obstante, en la mayoría de estudios previos,

la prevalencia de *Salmonella* spp. en aves silvestres ha sido baja (Reche *et al.*, 2003; Palmgren *et al.*, 2004; Jijon *et al.*, 2007; Molina-Lopez *et al.*, 2011; Botti *et al.*, 2013). El momento del muestreo puede influir en la detección de *Salmonella* spp. pues la excreción no se produce de manera constante, estando influenciada por factores como el estrés, que provoca una disbiosis y un aumento de la multiplicación de las bacterias y se excreta en grandes cantidades, este hecho queda demostrado en el estudio realizado por Marin y Lainez, (2009), en broilers durante su cría y antes y después de su transporte al matadero, en los que la excreción de *Salmonella* spp. variaba sensiblemente si se tomaba la muestra antes o después del transporte, siendo muy superior la presencia de *Salmonella* spp. en las muestras de heces tomadas después del transporte de las aves al matadero. Es por esta razón por la que se recomienda muestreos seriados en distintos momentos y ante distintas situaciones, para que si la bacteria está presente, pueda ser detectada.

En nuestro estudio, en ambos experimentos, las muestras de los buitres fueron tomadas inmediatamente después de ser capturados, y al tratarse de animales silvestres, su nivel de estrés era muy elevado ya que el método de captura y el manejo de los animales que no tienen contacto habitual con las personas, eleva su nivel de estrés de manera muy acusada. El tipo de muestra tomada también puede influir en la detección de la bacteria, Ingresa-Capaccioni *et al.*, (2015), realizó un estudio en broilers comparando el tipo de muestra tomado en la detección de *Campylobacter* spp., demostrando que en momentos donde el número de bacterias es bajo, los hisopos cloacales detectaron más casos positivos que otros medios como el cultivo de heces frescas o de contenido cecal, si bien en los momentos de máxima excreción del germen, los tres métodos detectaron a las bacterias. En el estudio de Ingresa-Capaccioni *et al.*, de 2015, se demostró también que el uso de calzas de celulosa, no detectó *Campylobacter* spp. en 9 de 20 rebaños que se habían confirmado como positivos. Por último, otra explicación para este porcentaje de *Salmonella* spp. tan elevado en comparación con estudios anteriores, sería la alimentación de los buitres, en su mayoría cadáveres de porcino en el caso de la población de buitres objeto de nuestro estudio.

Finalmente, y en referencia a la detección de micoplasmas en la población estudiada, de un total de los 71 buitres muestreados, 39 de ellos fueron positivos a

la presencia de laguna especie del género *Mycoplasma* spp. lo que corresponde al 54.93% de los animales muestreados. De los animales positivos, 29 (69.05%) de ellos lo fueron en la muestra tomada de la tráquea, 7 (16.67%) en la muestra de cloaca y 3 (7.14%) de ellos fueron positivos en ambas muestras. Por tanto, por tipo de muestra, fueron positivas el 45.07% de las muestras de tráquea y el 14.08% de las muestras de cloaca.

Entre el total de las 171 muestras, tanto de tráquea como de cloaca, 42 fueron positivas. Todas ellas resultaron positivas a la PCR específica para la detección de microorganismos del género *Mycoplasma*. De los aislamientos obtenidos, la identificación bioquímica previa de los microorganismos, evidenció la presencia de 4 perfiles bioquímicos diferentes, como se muestra en la tabla 11. El primer perfil y más común, (G- T+ U- A-) no fermenta la glucosa, reduce el tetrazolium, y no hidroliza la urea ni la arginina. A este perfil corresponden 32 de las 42 cepas. Otras dos de estos aislamientos corresponden a un segundo perfil (G+ T+ U- A-), que fermenta la glucosa, reduce el tetrazolium, y no hidrolizan la urea ni la arginina. También dos aislamientos presentan un tercer perfil (G- T+ U- A+) que no fermenta la glucosa, reduce el tetrazolium, no hidroliza la urea pero si la arginina. Un cuarto perfil lo presenta un sólo aislamiento, (G- T+ U+ A-) que no fermenta la glucosa, reduce el terazolium, hidroliza el uracilo y no la arginina. En 5 casos las pruebas bioquímicas resultaron fallidas.

Tabla 11: perfiles bioquímicos de las cepas de *Mycoplasma* spp. aisladas.

Perfil	Nº cepas
G- T+ U- A-	32
G+ T+ U- A-	2
G- T+ U- A+	2
G- T+ U+ A-	1

G: fermentación de la glucosa. **T:** reducción del tetrazolium. **U:** reducción del uracilo. **A:** reducción de la arginina.

Finalmente, la realización de la PCR del gen 16sARNr de nuestros cuatro tipos diferentes de aislamiento, su secuenciación y la comparación de las secuencias obtenidas, detalladas en el Anexo 1, con las que se encuentran en la base de datos de secuencias genéticas del sistema nacional de salud de EEUU (NIH), el GenBank,

(Tabla 12) evidencia que la secuencia de uno de nuestros aislamientos se asemeja en un 98% a la de *Mycoplasma aquilae*, aislamiento realizado de un águila imperial española (Spergser, datos no publicados) dato presente en el GenBanck pero no publicado hasta la fecha. Un segundo aislamiento se asemeja a este *Mycoplasma aquilae* en un 96%, ambos con el mismo perfil bioquímico. Encontramos un tercer aislamiento que es similar al 99% con una especie de *Mycoplasma* encontrada en buitres leonados (Lecis *et al.*, 2010), incluida en el grupo de *Mycoplasma hominis*. Y por último, un cuarto micoplasma presenta una similitud del 96% con *M. neophronis*, microorganismo aislado de otra ave carroñera, el alimoche canario o guirre (*Neophron percnopterus majorensis*), propia de las Islas Canarias. Estos datos podrían concluir que estamos ante cuatro especies de *Mycoplasma* no descritas hasta ahora, aunque serán necesarios estudios posteriores para demostrar esta afirmación.

Tabla 12: comparación de las secuencias de los 4 perfiles bioquímicos en el GenBanck.

Perfil	% similitud	especie
G- T+ U- A-	98	<i>M. aquilae</i>
	96	<i>M. aquilae</i>
G+ T+ U- A-	98	<i>M. aquilae</i>
G- T+ U- A+	96	<i>M. neophronis</i>
G- T+ U+ A-	99	<i>M. vericundum</i>
	99	<i>M. nov sp.</i>

G: fermentación de la glucosa. **T:** reducción del tetrazolium. **U:** reducción del uracilo. **A:** reducción de la arginina.

Al contrario de lo que sucede con las micoplasmosis que afectan a las especies asociadas a la producción aviar, en las que existe mucha información en referencia a la epidemiología, patogenia o control de las principales especies implicadas como *M. gallisepticum* o *M. synoviae*, la información asociada a su presencia e otras especies se limita principalmente a la descripción de su aislamiento. Así, diversas especies del genero *Mycoplasma* han sido descritas como microorganismos comensales y patógenos en distintas especies de aves silvestres (Winter *et al.*, 2003), tanto en aves paseriformes (Lierz *et al.*, 2007) como en diversas especies de aves rapaces como el halcón sacre, el halcón peregrino, el ratonero (Poveda *et al.*, 1990a; 1994)

el azor, el águila real (Lierz *et al.*, 2007), el aguilucho lagunero, el cernícalo común, el alcotán, el gavilán o la lechuza común (Lierz *et al.*, 2008).

Por otra parte, aislamientos de este género bacteriano también han sido aislados de especies de aves carroñeras de vida silvestre, como el buitre negro (Poveda *et al.*, 1990a), el buitre bengalí (Oaks *et al.*, 2004), Guirre (Suárez-Pérez *et al.*, 2012) y en coincidencia con lo observado en este trabajo, en diversas poblaciones de buitres leonados (Poveda *et al.*, 1990, 1994; Loria *et al.*, 2008; Lecis *et al.*, 2010).

A diferencia de muchos de los trabajos citados, incluyendo las descripciones de micoplasmas en buitres leonados, en el presente trabajo hemos tenido la posibilidad de estudiar un número mucho mayor de animales que en los trabajos previos, se han estudiado 71 animales frente a los 7 animales estudiados en el trabajo de Poveda *et al.*, en 1990(a) (1 halcón peregrino, 2 halcones sacre, 1 ratonero, 1 buitre negro y 2 buitres leonados) que presentaban signos de enfermedad en el tracto respiratorio superior, al igual que los 34 ejemplares de diversas especies de aves silvestres del trabajo de Winter *et al.*, 2003. Oaks *et al.*, en su trabajo de 2004 estudió el cadáver de un ejemplar de buitre bengalí; Lierz *et al.*, en 2008 estudio 16 ejemplares (5 cernícalos comunes, 1 alcotán, 5 gavilanes, 3 ratoneros, 1 aguilucho lagunero y una lechuza); Loria *et al.*, en 2008 y Lecis *et al.*, en 2010, 4 buitres leonados; Ruder *et al.*, en 2009, 1 buitre negro americano; y Suárez-Pérez *et al.*, en 2012, 4 guirres. Este hecho, unido a que los animales muestreados no presentaban sintomatología de ninguna patología, a diferencia de otros trabajos realizados sobre aves con síntomas clínicos, procedentes de centros de recuperación o incluso ya fallecidas, nos ha permitido, tras constatar la presencia de estos microorganismos en un elevado porcentaje de los animales muestreados (53.5%), evidenciar la presencia de muchos portadores asintomáticos de *Mycoplasma* spp. en estas poblaciones de vida silvestre, en concordancia con los resultados de Winter *et al.*, 2003 y Lierz *et al.*, 2008. En este sentido, al igual que otros autores (Poveda *et al.*, 1990a, b; Winter *et al.*, 2003; Lierz *et al.*, 2008; Loria *et al.*, 2008 y Lecis *et al.*, 2010) nuestro estudio evidencia la presencia de diferentes especies de micoplasma en la población estudiada, diferenciados tanto en sus características bioquímicas, como en las secuencias de ADN estudiadas del gen 16s ADNr, determinándose preliminarmente la presencia de al menos 4 microorganismos diferentes.

Por otra parte, y en relación al tipo de muestras analizadas, los aislamientos de micoplasma de buitres leonados existentes en la literatura se han obtenido de muestras procedentes del tracto respiratorio, concretamente, hisopos traqueales (Poveda *et al.*, 1990a, b,1994; Loria *et al.*, 2008; Lecis *et al.*, 2010). Solo en un estudio de un buitre negro americano, se localizan *Mycoplasma* spp. fuera del tracto respiratorio de aves necrófagas, en el que se aísla *M. corogypsi* en líquido sinovial de un ejemplar con patología articular (Ruder *et al.*, en 2009). En nuestro estudio, se ha aislado *Mycoplasma* spp. de muestras obtenidas de tráquea como en los trabajos anteriores, pero también en muestras obtenidas de cloaca, por primera vez, de aves silvestres. De los 71 animales muestreados, 10 de ellos dieron positivo a muestras tomadas de cloaca, incluso en tres de los animales estudiados se encontró *Mycoplasma* spp. en muestras de tráquea y de cloaca, hecho que hasta el momento no se ha descrito en la bibliografía.

Si bien, en nuestro estudio, no se determina la existencia de animales infectados y una posible sintomatología asociada, en los estudios realizados anteriormente, la presencia de *Mycoplasma* spp. en buitres leonados y en rapaces en general, está relacionada con animales enfermos con patologías respiratorias. Por otra parte, nuestros resultados, obtenidos en animales aparentemente sanos, pueden indicar el carácter oportunista de estos gérmenes en la especie estudiada, al igual que ocurre en otras especies de aves, tanto domesticas (aves de corral), como aves silvestres (los passeriformes) (Lierz *et al.*, 2007). Hecho que corrobora el mismo autor, en su estudio en 2008, en el que sugiere que los micoplasmas en las rapaces pueden ser comensales no patógenos, al evidenciar la presencia de estos gérmenes en animales sin signos clínicos procedentes de programas de anillado de rutina, como en nuestro estudio, y de aves de presa procedentes de centros de rehabilitación. No obstante, en otros casos también se ha determinado la presencia de estos microorganismos incluso en individuos con otro tipo de síntomas como en 1 buitre negro con patología articular, donde se ha aislado *Mycoplasma corogypsi* de líquido sinovial. Todo ello, evidencia la necesidad de realizar nuevos estudios que determinen la patogenicidad de todas estas especies, en especies de aves silvestres y, en general, de todas las especies de vida libre, pues además de actuar como reservorio de microorganismos que pueden afectar a animales de abasto, con las

consiguientes pérdidas económicas que esto supone, podrían suponer una causa de enfermedad y comprometer la conservación de algunas especies de vida libre.

Este carácter oportunista de las especies de micoplasma en especies de vida libre, capaces de recorrer grandes distancias, y que pueden actuar como agentes diseminadores, debería plantear la conveniencia de realizar controles en las poblaciones libres de buitres leonados, y en los movimientos de animales en proyectos de repoblación. En el trabajo de Loria *et al.*, en 2008, se aislaron en animales enfermos de un centro de rehabilitación de Sicilia, pertenecientes a un proyecto de reintroducción con animales procedentes de España. En este sentido ejemplares procedentes de la colonia estudiada, han sido translocados en programas de reintroducción de buitre leonado en el Sur de Italia (Calabria y Sicilia) y en Bulgaria, en las Gargantas de Kresna, entre el Parque Natural de Pirin y el de Rila, cerca de la frontera con Grecia, con el fin de establecer la definitiva conexión entre las poblaciones de buitres occidentales y orientales europeas (GREFA. Grupo de Rehabilitación de la Fauna Autóctona y su Habitat, 2012).

Los resultados de este estudio, demuestran que los buitres leonados silvestres pueden ser portadores y por tanto, un factor de riesgo a considerar en las infecciones por *Salmonella* spp. y *Mycoplasma* spp. pero a pesar de su detección en un ejemplar, no parecen tener un papel epidemiológico importante en la infección por *Campylobacter* spp. y su diseminación entre poblaciones silvestres y domésticas.

5.2. Experimento 2. Fuentes de infección de *Salmonella* spp. en el buitre leonado.

Durante las dos sesiones de muestreo que tuvieron lugar los meses de septiembre y octubre del 2015, se analizaron un total de 239 muestras. De las muestras recogidas directamente de los buitres leonados (n=104) se obtuvo un 21,2% de positividad, esto es 22 de las 104 muestras. Por lo que respecta a las granjas autorizadas (n=55), proveedoras de los cadáveres de los cerdos, se detectó presencia de *Salmonella* spp. en 8 de ellas, un 14,5%. Las muestras recogidas de la caseta donde se almacenan los cadáveres (n=30) fueron positivas a *Salmonella* spp. en un 30%, 9 de las 30 muestras. Por otro lado, de las muestras procedentes del vehículo de

transporte de cadáveres (n=30) estaban contaminadas por *Salmonella* spp. 25, lo que supone un 83,3%. Por último, los cadáveres (n=20), que se encontraban en el muladar, estaban contaminados superficialmente por la bacteria en un 40%, 8 de los 20 cadáveres muestreados (Tabla 13).

Tabla 13. Porcentaje de muestras positivas a *Salmonella* spp.

Tipo de muestra	n	<i>Salmonella</i> spp. (%)	ES
Granjas autorizadas	55	14,5 ^a	4,8
Caseta de recogida de cadáveres	30	30 ^{ab}	8,4
Vehículo de transporte	30	83.3 ^c	6,8
Cadáveres de porcino	20	40 ^b	11
Buitres	104	21,2 ^{ab}	4

n: número de muestras. %: porcentaje de muestras positivas a *Salmonella* spp. ^{a,b,c}, los diferentes superíndices indican diferencias estadísticamente significativas (P<0,05). **ES**: error estándar.

Estos cadáveres de porcino, son proporcionados por explotaciones ganaderas situadas en los alrededores de las colonias de buitres, cercanas al muladar donde se administran, que si bien se trata de explotaciones que deben cumplir un plan sanitario establecido, y que están sometidas a controles veterinarios oficiales, los cadáveres que se proporcionan a los buitres son animales que mueren en estas explotaciones por causas naturales, en la mayoría de los casos desconocidas, y se depositan en el muladar para la alimentación de los buitres sin someterse a ningún tipo de control sanitario previo, lo cual puede influir en que se encuentran presentes diferentes patógenos, además estos cadáveres son transportados en vehículos y almacenados en casetas hasta su llevada al muladar, donde puede existir una contaminación de estos cadáveres con gérmenes presentes en las superficies con las que entran en contacto.

Esta contaminación por gérmenes que pueden estar presentes en los vehículos de transporte ha sido demostrado en el estudio de Marin y Lainez, (2009), ya mencionado, y varios autores informaron también que los camiones de transporte frecuentemente pueden estar contaminados con la bacteria, siendo una fuente importante de contaminación con *Salmonella* spp. en pollos de engorde (Slader *et al.*, 2002; Heyndrickx *et al.*, 2002; Marin *et al.*, 2009). A pesar de esto, los buitres

tienen una elevada resistencia a manifestar sintomatología, por eso es muy importante conocer su papel como vector transmisor ya que aunque la infección no es evidente, actúan como vehículos de transmisión entre individuos de su misma especie, otros animales silvestres y el ganado, y teniendo en cuenta las largas distancias que estos animales pueden recorrer, su papel en la diseminación de zoonosis debe ser tenido en cuenta.

Por último, y en referencia a la caracterización molecular de los aislamientos, los resultados obtenidos tras realizar la ERIC-PCR sugieren que existe un perfil idéntico del 90% entre los serotipos aislados de la caseta de cadáveres, los buitres y el vehículo de transporte; entre los buitres y los cadáveres de los cerdos; entre la caseta de cadáveres, los buitres y las heces recogidas de las granjas de los cerdos; entre la caseta de los cadáveres y los cadáveres de los cerdos, así como entre el vehículo de transporte y los cadáveres de los cerdos (Figura 12). porcina son similares a la predominante en la población de buitres leonados silvestres.

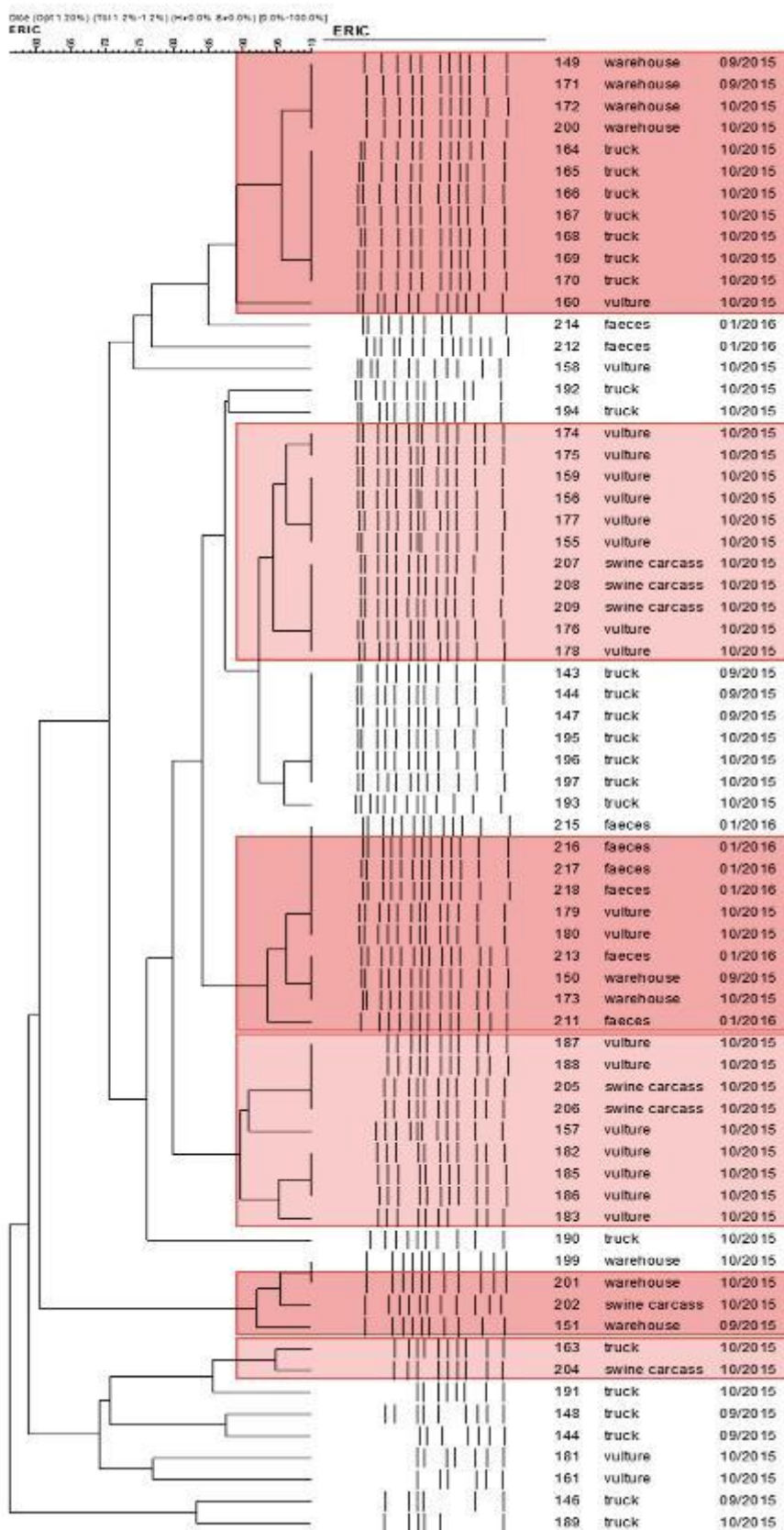


Figura 13. Dendrograma de la relación filogenética de las cepas de *Salmonella* spp. aisladas en buitres, cadáveres, casetas, vehículos y granjas de porcino. Los cuadros rojos agrupan los serotipos que presentan un perfil idéntico del 90%.

Warehouse: caseta de almacén de cadáveres. **Truck:** Vehículo de transporte. **Vulture:** Buitre. **Faeces:** heces. **Swine carcass:** Canal porcina

La alimentación artificial de las poblaciones silvestres de aves necrófagas, consiste en aportar alimento a estas aves, en unos puntos determinados, preparados para evitar que accedan otras especies y que proporcionen alimento de manera periódica, esta práctica que en principio pretende suplementar la dieta de las carroñeras ante una disminución de la disponibilidad de alimento, acaba por convertirse en la base de la dieta de los buitres, a los que proporciona alimento de una manera constante y predecible.

Hasta donde hemos sido capaces de conocer, este estudio ha sido el único, que sugiere la hipótesis de que dar comer de manera artificial a buitres leonados de vida silvestre, a base de cadáveres de cerdo, aunque provengan de granjas autorizadas sometidas a control veterinario y que cuentan con programas sanitarios aprobados por las autoridades competentes en materia de sanidad animal, podría ser el origen de que los buitres se infecten con *Salmonella* spp. Los lugares de alimentación artificial, como son los muladares, son herramientas importantes, recomendadas en todo el mundo para ayudar a los buitres, debido a la escasez de recursos, sobre todo tras la crisis de las «vacas locas» en la primera década de este siglo, y mantener y recupera así las poblaciones que se habían visto menguadas. Sin embargo, estos puntos de alimentación presentan ciertas desventajas, ya que, en ellos también se alimentan otras especies necrófagas como roedores, principalmente ratas, y pequeños córvidos que también pueden ser portadores de algunas patologías que aportan y comparten a sus compañeros de alimentación. También se alimentan allí algunas especies con un estado de conservación crítico como es el caso de los alimocho (*Neophron percnopterus*). Además, este tipo de aporte de alimentación provoca una concentración de buitres alrededor de los muladares y provoca importantes problemas demográficos creando efectos indeseables en la población, como la reducción de la dispersión y alteraciones en el apareamiento, que en última instancia reducen la productividad de las poblaciones de buitre leonado (Carrete *et al.*, 2006). Los buitres se acomodan a los muladares y dejan de presentar patrones de comportamiento típicos de su especie, como por ejemplo buscar alimento (Giraldeau y Caraco, 2000; Deygout *et al.*, 2009).

Blanco, (2014b), demostró que algunas cepas de *Salmonella* spp., aisladas a partir de heces de aves, que habían sido alimentados con cadáveres de porcino, eran la

causa de un aumento en la mortalidad de estas aves, lo cual es extraño porque mayoritariamente *Salmonella* spp. no causa síntomas clínicos en las aves, sin embargo en esta ocasión se trató de una cepa altamente patógena. Por lo que al final de su estudio, sugirió la importancia de estudiar la relación entre las cepas aisladas en las aves, con las cepas aisladas en la comida que se les proporciona.

Los buitres leonados infectados con *Salmonella* spp. normalmente son asintomáticos, pero pueden actuar como vectores diseminadores de la bacteria, propagando así enfermedades a través de sus largos desplazamientos y transfiriendo bacterias zoonóticas a grandes distancias a través de la excreción de estas junto con las heces (Benskin *et al.*, 2009). Los buitres realizan dos tipos de movimientos, uno regular en busca de comida en el que en función de los días que lleve sin comer recorren mayor o menor distancia. Otro movimiento que realizan los buitres es el de dispersión por el que los individuos juveniles abandonan sus colonias natales hacia finales de octubre, y recorren distancias diarias de 32-54 km dirigiéndose hacia el sur hasta llegar a la zona del Estrecho de Gibraltar donde se reúnen para cruzarlo. En el año 2000 se contó el paso del estrecho de 4 816 buitres leonados (Garrido *et al.*, 2005). Han sido recuperados buitres anillados en España, en Marruecos, Argelia, Túnez, Mauritania, Mali, Senegal y Gambia, y hacia el norte, en movimientos que se producen entre abril y septiembre, en Francia, Suiza, Holanda, Polonia y Bulgaria (Salvador, 2016).

En este contexto, este experimento sugiere que las cepas de *Salmonella* spp. que infectan a los buitres, y las aisladas en las granjas de cerdos de donde provienen los cadáveres que se utilizan para dar de comer a estos buitres, son genéticamente idénticas. Esta relación filogenética se ha demostrado también con todas las instalaciones que están en estrecho contacto con los cadáveres de cerdos, como son el vehículo de transporte y las casetas donde se almacenan los cadáveres hasta que son depositados en los muladares. Es importante resaltar el alto porcentaje de *Salmonella* spp. encontrado en el vehículo de transporte (83,3%). *Salmonella* spp. puede sobrevivir hasta dos años en el ambiente, especialmente creando *biofilm* en la superficie metálica de los vehículos (Ramesh *et al.*, 2002; Heyndrickx *et al.*, 2002; Marin *et al.*, 2009). Marin *et al.*, (2009) en su estudio sobre la capacidad de desarrollo de *biofilm* por *Salmonella* spp. aisladas en aves de corral y su resistencia a los

desinfectantes, vieron que los factores de riesgo más importantes en la infección por *Salmonella* spp. son el polvo, las superficies y las heces.

Con independencia del origen de los diferentes serotipos que se aislaron, alrededor del 50% fueron capaces de producir *biofilm*, por lo que un inadecuado procedimiento de limpieza y desinfección podría infectar a los animales que tuviesen contacto con superficies contaminadas y otros fómites (Rose *et al.*, 2000). En este estudio de Marin *et al.*, en 2009, se identificaron los vehículos de transporte de los animales como un importante factor en la transmisión de *Salmonella* spp. Finalmente, determinaron que, si bien, el uso de glutaraldehído, formaldehído, o de peróxido de hidrogeno en una concentración de 1,0% en condiciones de campo son suficientes para erradicar la *Salmonella* spp., no son adecuados para la eliminación de *Salmonella* spp. cuando se produce el *biofilm*, con independencia del serotipo y el tiempo de contacto con el desinfectante. A pesar de que la prevalencia en las granjas no es especialmente elevada, el acantonamiento de la bacteria en el vehículo puede contaminar los cadáveres que se encuentren libres de *Salmonella* spp. durante su transporte, siendo origen de infección para los buitres. En nuestro estudio, el vehículo de transporte, es utilizado para llevar cadáveres de diferentes especies, de diferentes orígenes y a diferentes destinos, todos muertos en explotación por causas muy diversas y en la mayoría de casos desconocidas. Y aunque la legislación obliga a la desinfección del vehículo antes y después de cada transporte (CE, 2011), si el producto y el método de desinfección no es el adecuado, esto supone un factor importante que favorece la dispersión de la bacteria, pues todo el material transportado en el vehículo es susceptible de contaminarse por *Salmonella* spp. y transmitir la infección a los buitres u otros animales que se alimenten de ellos. Del mismo modo, la bacteria puede sobrevivir durante largos periodos de tiempo en las casetas donde se almacenan los cadáveres, pudiendo ser causa de una contaminación cruzada entre los cadáveres que se encuentran libres de la bacteria y los que no. Por consiguiente, es esencial aplicar adecuados protocolos de limpieza y desinfección, tanto en los vehículos de transporte, como en las casetas donde se almacenan los cadáveres, de manera que se evite la recirculación de la bacteria. Algunos autores han demostrado la ineficacia de los desinfectantes habituales frente a el *biofilm* creado por algunas cepas de *Salmonella* spp. en determinadas superficies (Marin *et al.*, 2009; Corcoran *et al.*, 2014), pero el

efecto de los desinfectantes frente a este *biofilm* creado por *Salmonella* spp. mejora significativamente cuando el *biofilm* creció en presencia de furanona. El pretratamiento con furanona potenció significativamente el efecto de desinfectantes como el hipoclorito de sodio de benzalconio. Esto es probablemente debido a un efecto sobre la formación y composición del *biofilm*, lo que proporciona nuevos elementos muy interesantes en la lucha contra el *biofilm* producido por algunas cepas de *Salmonella* spp. en el medio ambiente debido al efecto potenciado de desinfectantes convencionales (Vestby *et al.*, 2010).

Además, se deberían establecer protocolos de muestreo periódicos para *Salmonella* spp. en las granjas autorizadas que proveen los cadáveres de cerdo para la alimentación de especies necrófagas como el buitre leonado, en las casetas de almacenamiento de cadáveres y en los vehículos de transporte de estos cadáveres, de manera que, si una muestra recogida en cualquiera de estos puntos, es positiva a *Salmonella* spp., se puedan tomar medidas para impedir la recirculación de la bacteria. Estos resultados sugieren que las autoridades y los ganaderos deben trabajar de forma conjunta para eliminar el riesgo de infección por *Salmonella* spp. en la vida silvestre.

6. CONCLUSIONES.

6. CONCLUSIONES.

- **Primera:** Se ha detectado un elevado porcentaje de *Salmonella* Typhimurium (82.3%) y en menor medida de otros serotipos como *S. Rissen* (7.8), *S. Senftenberg* (5.9) y *S. 4,12: b [-]* (3.9) en los buitres leonados silvestres estudiados, lo que permite afirmar que los buitres leonados son una importante fuente de diseminación de *Salmonella* spp. en el medio ambiente.
- **Segunda:** *Campylobacter* spp. (*C. jejuni*) se aisló puntualmente en la población de buitres leonados estudiado, sugiriendo un papel epidemiológico menor en la epidemiología de esta infección.
- **Tercera:** Existe una relación genética entre las cepas de *Salmonella* aisladas en los buitres y las recuperadas de localizaciones asociadas a la producción porcina de procedencia de los cadáveres de los que se alimentan o a su transporte y manejo.
- **Cuarta:** Se evidencia la presencia de portadores asintomáticos de *Mycoplasma* spp. en buitres leonados silvestres, tanto en el aparato respiratorio como en cloaca, detectándose por primera vez en esta última región anatómica.
- **Quinta:** Se han aislado 4 posibles nuevas especies del género *Mycoplasma* en buitre leonado.

7. RESUMEN.

7. RESUMEN.

Campylobacter spp. y *Salmonella* spp., son dos agentes zoonóticos de alta incidencia en los seres humanos y la micoplasmosis aviar tiene un gran impacto económico en las aves de corral. Su presencia en ejemplares de fauna silvestre puede ser un factor de riesgo en la epidemiología de las enfermedades causadas por estos microorganismos, presentes algunos de ellos en la avicultura. A pesar de ello, su prevalencia en las especies silvestres es hasta ahora desconocido. En este contexto, hay muy pocos estudios en los que se ha evaluado la presencia de *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. o *Mycoplasma* spp. en el buitre leonado y la información disponible ha sido obtenida en un pequeño número de individuos.

El primer experimento de este estudio comprobó la presencia de las tres bacterias en buitres de vida libre de una población del este de España, capturados para marcaje, en el muladar de Cincorres en la provincia de Castellón. Se han comparado los resultados microbiológicos obtenidos en base a la edad de los ejemplares estudiados (para *Campylobacter* spp. y *Salmonella* spp.) diferenciándose entre juveniles, subadultos y adultos. Así, en 1 y 51 de los 97 buitres atrapado lo aisló *Campylobacter jejuni* y *Salmonella* spp. respectivamente. No se hallaron diferencias en función de la edad de los animales que observamos. En cuanto al género *Salmonella* spp., seis serovariantes diferentes de dos subespecies de *Salmonella entérica* fueron aislados. *S. entérica* subsp. *entérica* (n = 49, 96,1%) y *S. entérica* subsp. *salamae* (n = 2, 3,9%). Se aislaron los serovariantes *S. Typhimurium* (n = 42, 82,3%), *S. Rissen* (n = 4, 7,8%), *S. Senftenberg* (n = 3, 5,9%) y *S. 4,12 b [-]* (n = 2, 3,9%). Por otro lado, la presencia de *Mycoplasma* spp. se evidenció en 39 de 71 buitres (54,9%) de las muestras tomadas de tráquea y cloaca. Este es el primer trabajo en la literatura que evidencia el aislamiento de estos microorganismos a partir de hisopos cloacales de buitres leonados de vida libre. Después de una identificación bioquímica y molecular, la secuencia de ARN 16S de estos aislamientos sugirió la presencia de cuatro nuevas especies de *Mycoplasma* spp. nunca descritas. Son necesarios estudios adicionales. Así, los resultados obtenidos mostraron la presencia de un alto número de portadores asintomáticos de *Salmonella* spp. o *Mycoplasma* spp. y son necesarios más estudios para evaluar si el buitre leonado puede jugar un papel epidemiológico de interés para ambas

infecciones. Por otra parte, *Campylobacter* spp. se pueden detectar en esta especie aviar a pesar de que su presencia podría ser esporádica. Estos resultados deberían confirmarse con otros estudios.

En un segundo experimento tratamos de observar si las *Salmonellas* spp. halladas en los buitres podrían estar relacionadas con el alimento aportado en los muladares, ya que las serovariantes encontradas se hallan frecuentemente en el ganado porcino, que es lo que se les administra en los muladares de la zona. Se tomaron muestras de las explotaciones de porcino, desde las cuales se administran los cadáveres al muladar (n=55), del vehículo de transporte (n=30), de los contenedores donde se almacenan los cadáveres antes de ser llevados al muladar (n=30), y de los cadáveres aportados en el muladar (n=20) y se compararon con las obtenidas de los buitres (n=104). *Salmonella* spp. se ha aislado en un 14.5% de las de las muestras tomadas en las explotaciones de porcino, un 32.3% de las muestras tomadas en los contenedores del almacén de cadáveres, un 83.3% de las muestras tomadas en los vehículos de transporte y un 40% de las muestras tomadas en los cadáveres del muladar. Los análisis mostraron que existe una relación genética entre las cepas aisladas en los contenedores de cadáveres, los buitres y el vehículo de transporte; en los buitres y los cadáveres de los cerdos; en los contenedores de los cadáveres, los buitres y heces recogidas de las granjas de cerdos; en los contenedores de los cadáveres y los cadáveres de cerdos; y en el vehículo de transporte y los cadáveres de los cerdos. Por lo tanto, se deben establecer protocolos eficaces de limpieza y desinfección de vehículos y locales donde se almacenan los cadáveres que se han de administrar a los buitres, incluso establecer controles para detectar *Salmonella* spp, y poder tomar medidas para detener su dispersión.

8. ABSTRACT.

8. ABSTRACT.

Campylobacter spp. and *Salmonella* spp., are two zoonotic agents of high incidence in humans and avian mycoplasmosis have a great economic impact in poultry. Their presence in specimens of wild animals can be a risk factor in the epidemiology of the diseases caused by all these microorganisms, the emergence of some of them in poultry farming. Despite it, its prevalence in these wild species is so far unknown. In this context, there are very few studies that have evaluated the presence of *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. or *Mycoplasma* spp. in griffon vulture and the information available have been obtained in a small number of individuals.

The first experiment of our study tested for the presence of all these 3 bacteria in vultures living in a population of Eastern Spain, captured for tagging, on the dunghill of Cincorres in the province of Castellón. We compared the microbiological results obtained based on the age of the specimens studied (for *Campylobacter* spp. and *Salmonella* spp.), differentiating between juveniles, sub-adults and adults. Thus, in 1 and 51 of the 97 vultures caught was isolated *Campylobacter jejuni* and *Salmonella* spp. respectively. No differences depending on the age of the animals was observed. Considering the genus *Salmonella* spp., 6 different serovars of two subspecies of *Salmonella enterica* were isolated. *S. enterica* subsp. *enterica* (n = 49, 96.1%) and *S. enterica* subsp. *salamae* (n = 2, 3.9%). The serovars isolated were *S. Typhimurium* (n = 42, 82.3%), *S. Rissen* (n = 4, 7.8%), *S. Senftenberg* (n = 3, 5.9%) and *S. 4.12: b [-]* (n = 2, 3.9%). On the other hand, the presence of *Mycoplasma* spp. was evidenced in 39 of 71 vultures (54.9%) of samples taken from the trachea or sewage samples. This is the first report in the literature about the recovery of these microorganisms from vulture's sewage swabs. After a biochemical and molecular identification, the 16SRNA sequence of these isolates suggested the presence of 4 new species of *Mycoplasma* spp. never described. Further studies are necessary. Thus, results obtained showed the presence of a high number of asymptomatic carriers of *Salmonella* spp. or *Mycoplasma* spp. and further studies are necessary to evaluate if the griffon vulture can play an epidemiological role of interest for both infections. Moreover, *Campylobacter* spp. can be also detected in this avian species although their presence could be sporadic. These results should be confirmed with other studies.

A second experiment was conducted to compare the genetical characteristics of the *Salmonella* spp. isolates taken from vultures or from the food provided, as serovars are frequently found in pigs, which is what are given in the dunghills in the area. Samples of pig farms were taken, from the carcasses are transported to the dunghill (n = 55), of the transport vehicle (n = 30), of the containers where the carcasses were stored before were administered on the dunghill (n = 30), and of carcasses provided in the dunghill (n = 20) and compared with those obtained from the vultures (n = 104). *Salmonella* spp. was isolated in 14.5% of samples taken in pig farms, 32.3% of the samples taken in the warehouse containers of carcasses, 83.3% of the samples taken in transport vehicles and 40% of the samples taken in the carcasses of the dunghill. Analyses showed that exists a genetic relationship between the strains isolated in the containers of carcasses, vultures and the transport vehicle; in vultures and carcasses of pigs; in the containers of carcasses, vultures and faeces collected from farms pigs; in the containers of carcasses and carcasses of pigs; and in the transport vehicle and the carcasses of pigs. Thus, to establish effective protocols for cleaning and disinfecting vehicles and premises in which the carcasses are going to be administered to the vultures or even set controls to detect *Salmonella* spp should be conducted.

9. AGRADECIMIENTOS.

9. AGRADECIMIENTOS.

Este trabajo no hubiera sido posible sin el apoyo, la ayuda y la colaboración de diversas personas a las que no quisiera dejar de nombrar y agradecer de manera muy especial, su trabajo y su esfuerzo.

En primer lugar a mis Directores. A Santiago Vega García, que me brindó esta oportunidad, a Clara Marín Orenga por su infinita paciencia, y a Christian de la Fe Rodríguez, que sin conocerme se unió a esta aventura y que ha hecho posible la culminación de este trabajo. A los tres, gracias por vuestro apoyo y vuestras enseñanzas.

Al Grupo de Investigación en el Departamento de Producción y Sanidad Animal, Salud Pública Veterinaria y Ciencia y Tecnología de los Alimentos (PASACTA) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad CEU Cardenal Herrera, especialmente a Sandra Sevilla Navarro y Sara González Bodí, por su trabajo, sus consejos y su disponibilidad.

Al Grupo de Investigación de Sanidad Caprina de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia, especialmente a Ángel Gómez Martín, trabajador incansable, por haberme hecho disfrutar con largas sesiones alineando secuencias de ADN.

Al personal del Centro de Recuperación de Fauna del *Forn del Vidre* Martin Surroca Royo, Sara Ferreras Viruete, Teresa de Chiclana Gadea y Mario Vidal Vericat, del Centro de Recuperación de Fauna “La Granja de El Saler” Daniel Mons García y Domingo Cruz Aparisi, cruciales para la realización de este trabajo, por su profesionalidad y dedicación en la captura y manejo de los buitres. Al resto del personal y a su Director Juan Antonio Gómez López.

Una mención muy especial a José María Gil Puerto, compañero, maestro y amigo.

Al Servicio de Vida Silvestre, al Jefe del Servicio Juan Jiménez Pérez, que confió en mí hace ya algunos años, que ha facilitado todos los trabajos de este proyecto y que

junto con todos los miembros del servicio han conseguido mantener en mí la ilusión, por este y por otros proyectos.

A Juan Monoto, por su paciencia y su apoyo incondicional, y por su inestimable ayuda en la edición de este texto.

A mis padres por enseñarme a luchar por mis sueños y que con esfuerzo uno puede conseguir aquello que se proponga. Y a mis hijos que han vivido este proyecto con la misma ilusión que yo, por su apoyo y su comprensión.

10. BIBLIOGRAFÍA.

10. BIBLIOGRAFIA.

- Aarestrup, F. M.** (2005) «Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of animal origin.», *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 96(4), pp. 271-281. doi: 10.1111/j.1742-7843.2005.pto960401.x.
- Acha, A., Blanco, G., Ruiz, P., Martínez, F., & Doval, G.** (1998) «A great banquet at a Spanish vulture restaurant. Does Europe end at the Pyrenees?», *Vulture News*, 39, pp. 34-39.
- Adelantado, C., Arosemena, L., Calvo, M., Manteca, L., Martín, M., Ordoñez, G., Ponsa, F., Pontes, M., Rodriguez, E. y Zekaria, D.** (2008) «Un patógeno con historia.», en *La Salmonella de actualidad desde siempre*. Real Escuela. Barcelona, Spain, pp. 13-25.
- Ajene, A. N., Fischer Walker, C. L. y Black, R. E.** (2013) «Enteric pathogens and reactive arthritis: A systematic review of *Campylobacter*, *Salmonella* and *Shigella*-associated reactive arthritis», *Journal of Health, Population and Nutrition*, 31(3), pp. 299-307. doi: 10.3329/jhpn.v31i3.16515.
- Aljarallah, K. M. y Adams, M. R.** (2007) «Mechanisms of heat inactivation in *Salmonella* serotype Typhimurium as affected by low water activity at different temperatures», *Journal of Applied Microbiology*, 102(1), pp. 153-160. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03054.x.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. y Lipman, D. J.** (1990) «Basic local alignment search tool», *Journal of Molecular Biology*, 215(3), pp. 403-410. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Angulo, F. J., Johnson, K. R., Tauxe, R. V. y Cohen, M. L.** (2000) «Origins and Consequences of Antimicrobial-Resistant Nontyphoidal *Salmonella*: Implications for the Use of Fluoroquinolones in Food Animals», *Microbial Drug Resistance*, 6(1), pp. 77-83. doi: 10.1089/mdr.2000.6.77.
- Antia, R., Regoes, R. R., Koella, J. C. y Bergstrom, C. T.** (2003) «The role of evolution in the emergence of infectious diseases», *Nature*. Nature Publishing Group, 426(6967), pp. 658-661. doi: 10.1038/nature02104.
- Arguello, H., Alvarez-Ordoñez, A., Carvajal, A., Rubio, P. y Prieto, M.** (2013) «Role of slaughtering in *Salmonella* spreading and control in pork production.», *Journal of food protection*, 76(5), pp. 899-911. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-404.
- Astobiza, I., Barral, M., Ruiz-Fons, F., Barandika, J. F., Gerrikagoitia, X., Hurtado, A. y García-Pérez, A. L.** (2011) «Molecular investigation of the occurrence of *Coxiella burnetii* in wildlife and ticks in an endemic area», *Veterinary Microbiology*, 147(1), pp. 190-194. doi: 10.1016/j.vetmic.2010.05.046.

- Astorga, R. J. M., Salaberria, A. E., García, A. M., Jimenez, S. V., Martinez, A. C., García, A. A. y Casas, A. A.** (2007) «Surveillance and antimicrobial resistance of *Salmonella* strains isolated from slaughtered pigs in Spain.», *Journal of food protection*, 70(6), pp. 1502-6
- Asturnatura.com** (2009) *Gyps fulvus*, (*Hablizl*, 1783), *Asturnatura.com [en línea]* n 243. Disponible en: <https://www.asturnatura.com/especie/gyps-fulvus.html> (Accedido: 24 de febrero de 2017).
- de Ávila, A. R. A., Marques, S. C., Piccolli, R. H. y Schwan, R. F.** (2013) «Sensitivity to organic acids *in vitro* and *in situ* of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* isolated from fresh pork sausages», *Journal of Food Quality*, 36(3), pp. 155-163. doi: 10.1111/jfq.12026.
- Baquero, F. y Blázquez, J.** (1997) «Evolution of antibiotic resistance», *Trends in Ecology & Evolution*. Elsevier Current Trends, 12(12), pp. 482-487. doi: 10.1016/S0169-5347(97)01223-8.
- Benskin, C. M. H., Wilson, K., Jones, K. y Hartley, I. R.** (2009) «Bacterial pathogens in wild birds: A review of the frequency and effects of infection», *Biological Reviews*, pp. 349-373. doi: 10.1111/j.1469-185X.2008.00076.x.
- Bernis, F., De Juana, E., Del Hoyo, J., Ferrer, X., Fernández-Cruz, M., Sáez-Royuela, R. y Sargatal, J.** (1994) «Nombres en Castellano de las Aves del Mundo recomendados por la Sociedad Española de Ornitología (Segunda Parte: Falconiformes y Galliformes)», *Ardeola*, 41(2), pp. 183-191
- Berny, P., Vilagines, L., Cugnasse, J. M., Mastain, O., Chollet, J. Y., Joncour, G. y Razin, M.** (2015) «VIGILANCE POISON: Illegal poisoning and lead intoxication are the main factors affecting avian scavenger survival in the Pyrenees (France)», *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 118, pp. 71-82. doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.04.003.
- Beuchat, L. R. y Mann, D.** (2010) «Survival and growth of *Salmonella* in high-moisture pecan nutmeats, in-shell pecans, inedible nut components, and orchard soil.», *Journal of food protection*, 73(11), pp. 1975-1985.
- Bianchini, V., Borella, L., Benedetti, V., Parisi, A., Miccolupo, A., Santoro, E., Recordati, C. y Luini, M.** (2014) «Prevalence in bulk tank milk and epidemiology of *Campylobacter jejuni* in dairy herds in Northern Italy», *Applied and Environmental Microbiology*, 80(6), pp. 1832-1837. doi: 10.1128/AEM.03784-13.
- Blanco, G., Gajón, A., Doval, G. y Martínez, F.** (1998) «Absence of blood parasites in griffon vultures from Spain.», *Journal of wildlife diseases*, 34(3), pp. 640-643. doi: 10.7589/0090-3558-34.3.640.
- Blanco, G., Lemus, J. A. y Grande, J.** (2006) «Faecal bacteria associated with different diets of wintering red kites: Influence of livestock carcass dumps in

microflora alteration and pathogen acquisition», *Journal of Applied Ecology*, 43(5), pp. 990-998. doi: 10.1111/j.1365-2664.2006.01200.x.

Blanco, G., Lemus, J. A., Frías, O., Grande, J., Arroyo, B., Martínez, F. y Baniandrés, N. (2007a) «Contamination traps as trans-frontier management challenges: new research impact of refuse dumps on the conservation of avian scavengers», en *Environmental Research Trends*, pp. 153-203.

Blanco, G., Martínez, F. y Traverso, J. M. (2007b) «Pair bond and age distribution of breeding griffon vultures *Gyps fulvus* in relation to reproductive status and geographic area in Spain», *Ibis*. Blackwell Publishing Ltd, 139(1), pp. 180-183. doi: 10.1111/j.1474-919X.1997.tb04522.x.

Blanco, G. (2014a) «Can livestock carrion availability influence diet of wintering red kites? Implications of sanitary policies in ecosystem services and conservation», *Population Ecology*, 56, pp. 593-604. doi: 10.1007/s10144-014-0445-2.

Blanco, G. (2014b) «Influence of diet on the gastrointestinal flora of wintering red kites», *European Journal of Wildlife Research*, 60(4), pp. 695-698. doi: 10.1007/s10344-014-0820-5.

Blanco, J. C. y Gonzalez, J. L. (1992) *Libro rojo de los vertebrados de España*. Editado por Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación.

BOE (1985) «Instrumento de Ratificación de la Convención sobre la Conservación de las Especies Migratorias de Animales Silvestres, hecho en Bonn el 23 de junio de 1979», *Boletín Oficial del Estado*, 259, pp. 34071-34076.

BOE (1986) «Instrumento de ratificación del Convenio relativo a la conservación de la vida silvestre y del medio natural en Europa, hecho en Berna el 19 de septiembre de 1979», *Boletín Oficial del Estado*, 235, pp. 33547-33555.

BOE (1990) «Real Decreto 439/1990, de 30 de marzo, por el que se regula el Catálogo Nacional de Especies Amenazadas», *Boletín Oficial del Estado*, 82, pp. 9468-9471.

BOE (2011a) «Real Decreto 139/2011, de 4 de febrero, para el desarrollo del Listado de Especies Silvestres en Régimen de Protección Especial y del Catálogo Español de Especies Amenazadas», *Boletín Oficial del Estado*, 46, pp. 20912-20951.

BOE (2011b) «Real Decreto 1632/2011, de 14 de noviembre, por el que se regula la alimentación de determinadas especies de fauna silvestre con subproductos animales no destinados a consumo humano.», *Boletín Oficial del Estado*, 284, pp. 125535-125543.

BOE (2013) «Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las

normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia.», *Boletín Oficial del Estado*, 34, pp. 11370-11421.

Bolske, G. y Morner, T. (1982) «Isolation of a *Mycoplasma* sp. from three buzzards (*Buteo* spp.)», *Avian Dis*, 26(2), pp. 406-411.

Bosè, M., Duriez, O. y Sarrazin, F. (2012) «Intra-specific competition in foraging griffon vultures *Gyps fulvus*: 1. Dynamics of group feeding», *Bird Study*. BTO, 59(2), pp. 182-192. doi: 10.1080/00063657.2012.658639.

Botti, V., Navillod, F. V., Domenis, L., Orusa, R., Pepe, E., Robetto, S. y Guidetti, cristina (2013) «*Salmonella* spp. and antibiotic-resistant strains in wild mammals and birds in north-western Italy from 2002 to 2010», *Veterinaria Italiana*, 49, pp. 195-202. doi: 10.12834/VetIt.2013.492.201.208.

Bradbury, J. M. (1998) «Recovery of *Mycoplasmas* from Birds», en Miles, R. J. y Nicholas, R. A. J. (eds.) *Mycoplasma Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, pp. 45-51. doi: 10.1385/0-89603-525-5:45.

Brichetti, P. y Fracasso, G. (2003) *Ornitologia italiana. VOL.1 - GAVIDAE-FALCONIDAE*. Editado por A. Perdisa.

Broman, T., Palmgren, H., Bergstrom, S., Sellin, M., Waldenstrom, J., Danielsson-Tham, M.-L. y Olsen, B. (2002) «*Campylobacter jejuni* in Black-Headed Gulls (*Larus ridibundus*): Prevalence, Genotypes, and Influence on *C. jejuni* Epidemiology», *Journal of Clinical Microbiology*. American Society for Microbiology, 40(12), pp. 4594-4602. doi: 10.1128/JCM.40.12.4594-4602.2002.

Cabezón, O., García-Bocanegra, I., Molina-Lopez, R., Marco, I., Blanco, J. M., Höfle, U., Margalida, A., Bach-Raich, E., Darwich, L., Echeverría, I., Obón, E., Hernández, M., Lavin, S., Dubey, J. P. y Almería, S. (2011) «Seropositivity and risk factors associated with toxoplasma gondii infection in wild birds from Spain», *PLoS ONE*, 6.

Calleja, J. A., Casado, S., De los Reyes, J. M., Díaz, Á., García-Cervigón, A. I., Meléndez, L., Onrubia, A., Ortega, A. y Prieta, J. (2008) «Estas son nuestras aves», *Enciclopedia de las aves de España*. SEO BirdLife, Fundación BBVA.

Camiña, A. (2004) «Griffon vulture *Gyps fulvus* monitoring in Spain: current research and conservation projects», en Meyburg, B. U. y Chancellor, R. D. (eds.) *Raptor worldwide. Proceedings of the 6th world conference on birds of prey and owls*. Budapest: W.W.G.B.P. The World Working Group on Birds of Prey and Owl, pp. 45-66.

Camiña, A. y Montelío, E. (2006) «Griffon vulture *Gyps fulvus* Food Shortages in the Ebro Valley (NE Spain) Caused by Regulations Against Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE)», *Acta Ornithologica*. Museum and Institute of Zoology,

Polish Academy of Sciences, 41(1), pp. 7-13. doi: 10.3161/068.041.0106.

Camiña, A. y López, C. (2009) «Los buitres en España», *El Ecologista. Ecologistas en acción*, marzo, p. n^o 60.

Cardenal, A., Baticon, A. y Senosiáin, A. (1995) «Attacks on livestock by Eurasian griffons in northern Spain», *Journal of Raptor Research*, 29(3), p. 214.

Carius, H. J., Little, T. J. y Ebert, D. (2001) «Genetic variation in a host-parasite association: potential for coevolution and frequency-dependent selection.», *Evolution; international journal of organic evolution*, 55(6), pp. 1136-1145. doi: 10.1111/j.0014-3820.2001.tb00633.x.

Carrete, M., Donazar, J. A., Margalida, A. y Bertran, J. (2006) «Linking ecology, behaviour and conservation: does habitat saturation change the mating system of bearded vultures?», *Biology letters*, 2(4), pp. 624-7. doi: 10.1098/rsbl.2006.0498.

Cason, J. A., Bailey, J. S., Stern, N. J., Whittemore, A. D. y Cox, N. A. (1997) «Relationship between aerobic bacteria, *Salmonellae* and *Campylobacter* on broiler carcasses.», *Poultry science*, 76(7), pp. 1037-1041.

CDC (2008) «Multistate outbreak of human *Salmonella* infections associated with exposure to turtles--United States, 2007-2008.», *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 57(3), pp. 69-72. doi: 10.1001/jama.299.16.1892.

CDC (2016) *Salmonella Annual Summary 2013*. Atlanta.

CE (2002) «Reglamento (CE) n^o 1774/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo de 3 de octubre de 2002 por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a los subproductos animales no destinados al consumo humano», *Diario Oficial de la Union Europea*, L-273, pp. 1-95.

CE (2003) «Reglamento (CE) N^o 2160/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo de 17 de noviembre de 2003 sobre el control de la salmonela y otros agentes zoonóticos específicos transmitidos por los alimentos», *Diario Oficial de la Union Europea*, L 325, pp. 1-15.

CE (2011) «Reglamento (UE) No 142/2011 de la Comisión de 25 de febrero de 2011 por el que se establecen las disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) no 1069/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo por el que se establecen las normas sanitarias aplicables a», *Diario Oficial de la Union Europea*, L 54, pp. 1-306.

CEE (1979) «Directiva del Consejo de 2 de abril de 1979 relativa a la conservación de las aves silvestres», *Diario Oficial de las Comunidad Economica Europea*, L-103, pp. 1-41.

- Chamovitz, B. N., Hartstein, A. I., Alexander, S. R., Terry, A. B., Short, P. y Katon, R.** (1983) «*Campylobacter jejuni*-associated hemolytic-uremic syndrome in a mother and daughter», *Pediatrics*, 71(2), pp. 253-256.
- Chantarapanont, W., Berrang, M. y Frank, J. F.** (2003) «Direct microscopic observation and viability determination of *Campylobacter jejuni* on chicken skin.», *Journal of food protection*, 66(12), pp. 2222-2230.
- Chantepeie, S., Teplitsky, C., Pavard, S., Sarrazin, F., Descaves, B., Lecuyer, P. y Robert, A.** (2016) «Age-related variation and temporal patterns in the survival of a long-lived scavenger», *Oikos*. Blackwell Publishing Ltd, 125(2), pp. 167-178. doi: 10.1111/oik.02216.
- Chuma, T., Hashimoto, S. y Okamoto, K.** (2000) «Detection of thermophilic *Campylobacter* from sparrows by multiplex PCR: the role of sparrows as a source of contamination of broilers with *Campylobacter*.», *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 62(12), pp. 1291-1295. doi: 10.1292/jvms.62.1291.
- Clavero, M. R., Monk, J. D., Beuchat, L. R., Doyle, M. P. y Brackett, R. E.** (1994) «Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonellae*, and *Campylobacter jejuni* in raw ground beef by gamma irradiation.», *Applied and environmental microbiology*, 60(6), pp. 2069-2075.
- Clayton, D. H. y Moore, J. (eds.)** (1997) *Host-parasite evolution: general principles and avian models*. Oxford: Oxford University Press (OUP).
- Clements, J. F., Schulenberg, T. S., Liff, M. J., Sullivan, B. L. y Wood, C. L.** (2010) «The Clements Checklist of Birds of the World, Version 6.5», *Cornell University Press*.
- Coetzer, J. A. W. y Tustin, R. C.** (2004) «Infectious diseases of livestock», en *Infectious diseases of livestock*. Oxford University Press (OUP), p. Vol. 3:1578-1581.
- Colmegna, I., Cuchacovich, R. y Espinoza, L. R.** (2004) «HLA-B27-Associated Reactive Arthritis: Pathogenetic and Clinical Considerations», *Clinical Microbiology Reviews*, pp. 348-369. doi: 10.1128/CMR.17.2.348-369.2004.
- Conlan, A. J. K., Line, J. E., Hiatt, K., Coward, C., Van Diemen, P. M., Stevens, M. P., Jones, M. A., Gog, J. R. y Maskell, D. J.** (2011) «Transmission and dose-response experiments for social animals: a reappraisal of the colonization biology of *Campylobacter jejuni* in chickens.», *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*. The Royal Society, 8(65), pp. 1720-35. doi: 10.1098/rsif.2011.0125.
- Cooper, J. E.** (1975) «Haematological investigations in east African birds of prey.», *Journal of wildlife diseases*, 11(3), pp. 389-394.

- Corcoran, M., Morris, D., De Lappe, N., O'Connor, J., Lalor, P., Dockery, P. y Cormican, M.** (2014) «Commonly used disinfectants fail to eradicate *Salmonella enterica* biofilms from food contact surface materials», *Applied and Environmental Microbiology*, 80(4), pp. 1507-1514. doi: 10.1128/AEM.03109-13.
- Cortés, A., Jovani, R., Donazar, J. A. y Grimm, V.** (2014) «Bird sky networks: How do avian scavengers use social information to find carrion?», *Ecology*, 95(7), pp. 1799-1808. doi: 10.1890/13-0574.1.
- Cruchaga, S., Echeita, A., Aladueña, A., García-Peña, J., Frias, N. y Usera, M. a** (2001) «Antimicrobial resistance in *Salmonellae* from humans, food and animals in Spain in 1998.», *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 47(3), pp. 315-21. doi: 10.1093/jac/47.3.315.
- Van Damme, P., Martens, L., Van Damme, J., Hugelier, K., Staes, A., Vandekerckhove, J. y Gevaert, K.** (2005) «Caspase-specific and nonspecific in vivo protein processing during Fas-induced apoptosis.», *Nature methods*, 2(10), pp. 771-777. doi: 10.1038/nmeth792.
- Darwich, L., Cabezon, O., Echeverria, I., Pabon, M., Marco, I., Molina-Lopez, R., Alarcia-Alejos, O., Lopez-Gatius, F., Lavin, S. y Almeria, S.** (2012) «Presence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* DNA in the brain of wild birds», *Veterinary Parasitology*, 183(3-4), pp. 377-381. doi: 10.1016/j.vetpar.2011.07.024.
- Daszak, P., Cunningham, A. A. y Hyatt, A. D.** (2000) «Emerging infectious diseases of wildlife - threats to biodiversity and human health», *Science*, 287(January), pp. 443-449. doi: 10.1126/science.287.5452.443.
- David, O. M., Wandili, S., Kakai, R. y Waindi, E. N.** (2009) «Isolation of *Salmonella* and *Shigella* from fish harvested from the Winam Gulf of Lake Victoria, Kenya», *Journal of Infection in Developing Countries*, 3(2), pp. 99-104. doi: 10.3855/jidc.56.
- Davies, R. H. y Wales, A. D.** (2013) «*Salmonella* contamination of cereal ingredients for animal feeds», *Veterinary Microbiology*, 166(3-4), pp. 543-549. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.07.003.
- Davison, T., Kaspers, B. y Schat, K. A. (eds.)** (2008) *Avian immunology*. 1.^a ed. Elsevier Ltd. doi: 10.1016/B978-0-12-396965-1.00018-2.
- Delahay, R. J., De Leeuw, A. N. S., Barlow, A. M., Clifton-Hadley, R. S. y Cheeseman, C. L.** (2002) «The status of *Mycobacterium bovis* infection in UK wild mammals: A review», *Veterinary Journal*, pp. 90-105. doi: 10.1053/tvjl.2001.0667.
- Delgado Fernández, R.** (2015) «Peculiaridad de la clasificación taxonómica y nomenclatura del género *Salmonella*», *Acta Médica del Centro*, pp. 73-75.
- Denis, M., Henrique, E., Chidaine, B., Tircot, A., Bougeard, S. y Fravallo, P.**

- (2011) «*Campylobacter* from sows in farrow-to-finish pig farms: Risk indicators and genetic diversity», *Veterinary Microbiology*, 154(1-2), pp. 163-170. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.07.001.
- Denis, M., Houard, E., Fablet, A., Rouxel, S. y Salvat, G.** (2013) «Distribution of serotypes and genotypes of *Salmonella enterica* species in French pig production.», *The Veterinary record*, 173(15), p. 370. doi: 10.1136/vr.101901.
- Deogratias, A.-P., Mushi, M. F., Paterno, L., Tappe, D., Seni, J., Kabymera, R., Kidenya, B. R. y Mshana, S. E.** (2014) «Prevalence and determinants of *Campylobacter* infection among under five children with acute watery diarrhea in Mwanza, North Tanzania.», *Archives of public health = Archives belges de santé publique*, 72(1), p. 17. doi: 10.1186/2049-3258-72-17.
- Deygout, C., Gault, A., Sarrazin, F. y Bessa-Gomes, C.** (2009) «Modeling the impact of feeding stations on vulture scavenging service efficiency», *Ecological Modelling*, 220(15), pp. 1826-1835. doi: 10.1016/j.ecolmodel.2009.04.030.
- Dobson, A. y Foufopoulos, J.** (2001) «Emerging infectious pathogens of wildlife.», *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 356(1411), pp. 1001-12. doi: 10.1098/rstb.2001.0900.
- DOGV** (2004) «DECRETO 32/2004, de 27 de febrero, del Consell de la Generalitat, por el que se crea y regula el Catálogo Valenciano de Especies de Fauna Amenazadas, y se establecen categorías y normas para su protección.», *Diario Oficial de la Generalitat Valenciana*, 4705.
- Dolejska, M., Cizek, A. y Literak, I.** (2007) «High prevalence of antimicrobial-resistant genes and integrons in *Escherichia coli* isolates from Black-headed Gulls in the Czech Republic», *Journal of Applied Microbiology*, 103(1), pp. 11-19. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03241.x.
- Donazar, J. A.** (1993) *Los buitres ibéricos. Biología y conservación*. Editado por J. M. Reyero.
- Donazar, J. A.** (1997) «La falsa polémica sobre el buitre leonado. Carroñeros o predadores?», *Quercus*, p. n° 136:16-17.
- Donazar, J. A.** (2009) «Prologo», en Del Moral, J. y SEO BirdLife (eds.) *El buitre leonado en España. Población reproductora en 2008 y método de censo*.
- Donazar, J. A., Cortés, A. y Carrete, M.** (2010) «Dietary shifts in two vultures after the demise of supplementary feeding stations: consequences of the EU sanitary legislation», *European Journal of Wildlife Research*, 56(4), pp. 613-621. doi: 10.1007/s10344-009-0358-0.
- Doyle, M. P. y Erickson, M. C.** (2006) «Reducing the Carriage of Foodborne

- Pathogens in Livestock and Poultry», *Poultry Science*, 85(6), pp. 960-973. doi: 10.1093/ps/85.6.960.
- Duarte, A., Santos, A., Manageiro, V., Martins, A., Fraqueza, M. J., Caniça, M., Domingues, F. C. y Oleastro, M.** (2014) «Human, food and animal *Campylobacter* spp. isolated in Portugal: High genetic diversity and antibiotic resistance rates», *International Journal of Antimicrobial Agents*, pp. 6-13. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2014.06.012.
- Ducatez, M. F., Tarnagda, Z., Tahita, M. C., Sow, A., De Landtsheer, S., Londt, B. Z., Brown, I. H., Osterhaus, A. D. M. E., Fouchier, R. A. M., Ouedraogo, J. B. B. y Muller, C. P.** (2007) «Genetic characterization of HPAI (H5N1) viruses from poultry and wild vultures, Burkina Faso», *Emerging Infectious Diseases*, 13(4), pp. 611-613. doi: 10.3201/eid1304.061356.
- Duriez, O., Herman, S. y Sarrazin, F.** (2012) «Intra-specific competition in foraging Griffon Vultures *Gyps fulvus*: 2. The influence of supplementary feeding management», *Bird Study*, 59(2), pp. 193-206. doi: 10.1080/00063657.2012.658640.
- Dybdahl, M. E. y Lively, C. M.** (1998) «Host-parasite coevolution: evidence for rare advantage and time-lagged selection in a natural population», *Evolution*, 52(4), pp. 1057-1066. doi: 10.2307/2411236.
- EFSA** (2014) «The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011», *EFSA Journal*, 9(3), p. 2090. doi: 10.2903/j.efsa.2014.3547.
- EFSA** (2015) «The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2014», *EFSA Journal*, 13(12), p. 3547. doi: 10.2903/j.efsa.2015.4329.
- EFSA** (2016) «The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015», *EFSA Journal*, 14(12), p. 3547. doi: 10.2903/j.efsa.2015.4329.
- Eideh, A. M. F. y Al-Qadiri, H. M.** (2010) «Effect of Refrigerated and Frozen Storage on the Survival of *Campylobacter jejuni* in Cooked Chicken Meat Breast», *Journal of Food Science*, 76(1), pp. 17-21. doi: 10.1111/j.1750-3841.2010.01924.x.
- Estrada-Pena, A., Lucientes, J. y Sanchez, C.** (1987) «Argas (Persicargas) gilcolladoi n. sp. (Acarina: Argasidae): A Parasite of the Griffon Vulture, *Gyps fulvus*, in Spain», *The Journal of Parasitology*, 73(4), p. 824. doi: 10.2307/3282421.
- FAO/OMS** (2009) *Salmonella and Campylobacter in chicken meat*. Roma: MICROBIOLOGICAL RISK ASSESSMENT SERIES

- Farace, M. I. y Viñas, M. R.** (2007) *Manual de Procedimientos Para el Aislamiento y Caracterización de Campylobacter spp.* WHO Global Salm Surv
- Fearnley, E., Raupach, J., Lagala, F. y Cameron, S.** (2011) «*Salmonella* in chicken meat, eggs and humans; Adelaide, South Australia, 2008», *International Journal of Food Microbiology*, 146(3), pp. 219-227. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.004.
- Ferrer, M., Garcia Rodriguez, T., Carrillo, J. C. y Castroviejo, J.** (1987) «Hematocrit and Blood-Chemistry Values in Captive Raptors (Gyps-Fulvus, Buteo-Buteo, Milvus-Migrans, Aquila-Heliaca)», *Comparative Biochemistry and Physiology a-Physiology*, 87(4), pp. 1123-1127
- French, N. P., Midwinter, A., Holland, B., Collins-Emerson, J., Pattison, R., Colles, F. y Carter, P.** (2009) «Molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni* isolates from wild-bird fecal material in children's playgrounds», *Applied and Environmental Microbiology*, 75(3), pp. 779-783. doi: 10.1128/AEM.01979-08.
- Friedman, C. R.** (2000) *Epidemiology of Campylobacter jejuni infections in the United States and other industrialized nations*. 2.^a ed, *Campylobacter*. 2.^a ed. Editado por I. Nachamkin y M. J. Blaser. Washington D.C.: American Society for Microbiology
- Furr, P., Cooper, J. y Taylor-Robinson, D.** (1977) «Isolation of *Mycoplasmas* from three falcons (*Falco* spp)», *Veterinary Record*. BMJ Publishing Group Limited, 100(4), pp. 72-73. doi: 10.1136/vr.100.4.72.
- Garénaux, A., Ritz, M., Jugiau, F., Rama, F., Federighi, M. y De Jonge, R.** (2009) «Role of oxidative stress in *C. jejuni* inactivation during freeze-thaw treatment», *Current Microbiology*, 58(2), pp. 134-138. doi: 10.1007/s00284-008-9289-3.
- Garrido, J. R., Camiña, A., Guinda, M., Egea, M., Mouati, N. y Paz de la Rocha, J. L.** (2005) «Absence of the eurasian griffon (*Gyps fulvus*) in northern morocco», *Journal of Raptor Research*, 39(1), pp. 70-74
- Garriga, E.** (2009) «Invasio de les Illes per voltors forasters. Es Busqueret», *Es busqueret*, p. 37
- Gautam, D., Dobhal, S., Payton, M. E., Fletcher, J. y Ma, L. M.** (2014) «Surface survival and internalization of salmonella through natural cracks on developing cantaloupe fruits, alone or in the presence of the melon wilt pathogen *Erwinia tracheiphila*», *PloS one*, 9(8), p. e105248. doi: 10.1371/journal.pone.0105248.
- Van de Giessen, A. W.** (1996) «Epidemiology and control of *Salmonella enteritidis* and *Campylobacter* spp. in poultry flocks». Utrech.
- Gill, F. y Donsker, D.** (2016) *IOC World Bird List (v 6.3)*, *International Ornithologists Union Committee on Nomenclature*. doi: 10.14344/IOC.ML.6.3.

- Giraldeau, L.-A. y Caraco, T.** (2000) «Social foraging theory». Princeton University Press.
- Girdwood, R. W., Fricker, C. R., Munro, D., Shedden, C. B. y Monaghan, P.** (1985) «The incidence and significance of *Salmonella* carriage by gulls (*Larus* spp.) in Scotland.», *The Journal of hygiene*, 95(2), pp. 229-241. doi: 10.1017/S0022172400062665.
- Gomez-Villamandos, J., Mendez, A., Martin de las Mulas, J., Hervas, J. y Sierra, M.** (1995) «Histological and ultrastructural study of an unusual *herpesvirus* infection in owls (*Tyto albus*)», *Veterinary Record*. BMJ Publishing Group Limited, 136(24), pp. 614-615. doi: 10.1136/vr.136.24.614.
- Gradel, K. O., Nielsen, H. L., Schönheyder, H. C., Ejlersten, T., Kristensen, B. y Nielsen, H.** (2009) «Increased Short- and Long-Term Risk of Inflammatory Bowel Disease After *Salmonella* or *Campylobacter* Gastroenteritis», *Gastroenterology*, 137(2), pp. 495-501. doi: 10.1053/j.gastro.2009.04.001.
- Green, R. E., Newton, I., Shultz, S., Cunningham, A. A., Gilbert, M., Pain, D. J. y Prakash, V.** (2004) «Diclofenac poisoning as a cause of vulture population declines across the Indian subcontinent», *Journal of Applied Ecology*, 41(5), pp. 793-800. doi: 10.1111/j.0021-8901.2004.00954.x.
- GREFA. Grupo de Rehabilitación de la Fauna Autóctona y su Habitat** (2012) *Vulturnet: La conexión de las poblaciones europeas de buitres*. Disponible en: <http://www.grefa.org/proyectosgrefa/21-proyectos/vulturnet/27-vulturnet-la-conexion-de-las-poblaciones-europeas-de-buitres> (Accedido: 21 de febrero de 2017).
- Griekspoor, P., Colles, F. M., McCarthy, N. D., Hansbro, P. M., Ashhurst-Smith, C., Olsen, B., Hasselquist, D., Maiden, M. C. J. y Waldenström, J.** (2013) «Marked host specificity and lack of phylogeographic population structure of *Campylobacter jejuni* in wild birds», *Molecular Ecology*, 22(5), pp. 1463-1472. doi: 10.1111/mec.12144.
- Grimont, P. y Weill, F.-X.** (2008) *Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars*. Paris: Institut Pasteur
- Gruzdev, N., Pinto, R. y Sela, S.** (2011) «Effect of desiccation on tolerance of *Salmonella enterica* to multiple stresses», *Applied and Environmental Microbiology*, 77(5), pp. 1667-1673. doi: 10.1128/AEM.02156-10.
- Hamemeijer, W. y Blair, M. (eds.)** (1997) *The EBCC Atlas of European Breeding Birds: their distribution and abundance*. London: European Bird Census Council (EBCC)
- Handeland, K., Refsum, T., Johansen, B. S. S., Holstad, G., Knutsen, G., Solberg, I., Schulze, J. y Kapperud, G.** (2002) «Prevalence of *Salmonella*

- typhimurium infection in Norwegian hedgehog populations associated with two human disease outbreaks.», *Epidemiology and Infection*, 128(3), pp. 523-7. doi: 10.1017/S0950268802007021.
- Harbour, H. E., Abell, J. M., Cavanagh, P., Clegg, F. G., Gould, C. M., Ellis, P., Pike, M., Riley, C. T. y Laver, U.** (1978) *Salmonella: The food poisoner*. Editado por British Association for the Advancement of Science. London.
- Harrison, W. A., Griffith, C. J., Tennant, D. y Peters, A. C.** (2001) «Incidence of *Campylobacter* and *Salmonella* isolated from retail chicken and associated packaging in South Wales», *Letters in Applied Microbiology*. Blackwell Science Ltd, 33(6), pp. 450-454. doi: 10.1046/j.1472-765X.2001.01031.x.
- Hatch, J. J.** (1996) «Threats to public health from gulls (*Laridae*)», *International Journal of Environmental Health Research*, 6(1), pp. 5-16. doi: 10.1080/09603129609356867.
- Hawkey, C., Samour, H. J., Henderson, G. M. y Hart, M. G.** (1985) «Haematological findings in captive Gentoo penguins (*Pygoscelis papua*) with bumblefoot.», *Avian pathology: journal of the W.V.P.A.*, 14(2), pp. 251-6. doi: 10.1080/03079458508436226.
- Hendriksen, R. S., Bangtrakulnonth, A., Pulsrikarn, C., Pornreongwong, S., Hasman, H., Song, S. W. y Aarestrup, F. M.** (2008) «Antimicrobial resistance and molecular epidemiology of *Salmonella* Rissen from animals, food products, and patients in Thailand and Denmark.», *Foodborne pathogens and disease*, 5(5), pp. 605-619. doi: 10.1089/fpd.2007.0075.
- Hernandez, J., Bonnedahl, J., Waldenstrom, J., Palmgren, H. y Olsen, B.** (2003) «*Salmonella* in birds migrating through Sweden.», *Emerging Infectious Diseases*. U.S. National Center for Infectious Diseases, 9(6), pp. 753-756. doi: 10.3201/eid0906.030072.
- Hernández, M., Sánchez, C., Galka, M. E., Dominguez, L., Goyache, J., Oria, J. y Pizarro, M.** (2001) «Avian pox infection in Spanish Imperial eagles (*Aquila adalberti*)», *Avian Pathology*. Taylor & Francis Group, 30(1), pp. 91-97. doi: 10.1080/03079450020023258.
- Heyndrickx, M., Vandekerchove, D., Herman, L., Rollier, I., Grijspeerd, K. y De Zutter, L.** (2002) «Routes for salmonella contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery to slaughterhouse», *Epidemiology and Infection*. Cambridge University Press, 129(2), pp. 253-265. doi: 10.1017/S0950268802007380.
- Hoelzl, C., Mayerhofer, U., Steininger, M., Brüller, W., Hofstädter, D. y Aldrian, U.** (2013) «Observational trial of safe food handling behavior during food preparation using the example of *Campylobacter* spp.», *Journal of food protection*, 76(3), pp. 482-9. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-231.

- Höfle, U., Blanco, J. M. y Kaleta, E. F.** (2001) «Neutralising antibodies against infectious bursal disease virus in sera of free-living and captive birds of prey from central Spain (preliminary results)», en *Symposium on Infectious Bursal Disease Virus and Chicken Anemia*. Rauschholzhausen.
- Höfle, U., Blanco, J. M. y Kaleta, E. F.** (2002) «Seroprevalence of avian paramyxovirus 1, 2, and 3 in captive and free-living birds of prey in Spain (preliminary results): implications for management of wild and captive populations», *Annals of the New York Academy of Sciences*, 969(1), pp. 213-216. doi: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb04381.x.
- Horn, B. J. y Lake, R. J.** (2013) «Incubation period for campylobacteriosis and its importance in the estimation of incidence related to travel», *Eurosurveillance*, 18(40).
- Houston, D. C. y Cooper, J. E.** (1975) «The digestive tract of the whiteback griffon vulture and its role in disease transmission among wild ungulates.», *Journal of wildlife diseases*, 11(3), pp. 306-313.
- Hubálek, Z.** (2004) «An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds», *Journal of wildlife diseases*, 40(4), pp. 639-659. doi: 10.7589/0090-3558-40.4.639.
- Hudson, C. R., Quist, C., Lee, M. D., Keyes, K., Dodson, S. V., Morales, C., Sanchez, S., White, D. G. y Maurer, J. J.** (2000) «Genetic relatedness of *Salmonella* isolates from nondomestic birds in southeastern United States», *Journal of Clinical Microbiology*, 38(5), pp. 1860-1865.
- Hughes, L. A., Shopland, S., Wigley, P., Bradon, H., Leatherbarrow, A. H., Williams, N. J., Bennett, M., de Pinna, E., Lawson, B., Cunningham, A. A. y Chantrey, J.** (2008) «Characterisation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates from wild birds in northern England from 2005 – 2006», *BMC Veterinary Research*, 4(1), p. 4. doi: 10.1186/1746-6148-4-4.
- Humphrey, T. y Bygrave, A.** (1988) «Abortion in a cow associated with salmonella infection in badgers», *Veterinary Record*. BMJ Publishing Group Limited, 123(6), pp. 160-160. doi: 10.1136/vr.123.6.160.
- Ingesa-Capaccioni, S., González-Bodí, S., Jiménez-Trigos, E., Marco-Jiménez, F., Catalá, P., Vega, S. y Marin, C.** (2015) «Comparison of different sampling types across the rearing period in broiler flocks for isolation of *Campylobacter* spp.», *Poultry science*. Oxford University Press, 94(4), pp. 766-771. doi: 10.3382/ps/pev023.
- Issenhuth-Jeanjean, S., Roggentin, P., Mikoleit, M., Guibourdenche, M., de Pinna, E., Nair, S., Fields, P. I. y Weill, F.-X.** (2014) «Supplement 2008–2010 (no. 48) to the White–Kauffmann–Le Minor scheme», *Research in Microbiology*, 165(7), pp. 526-530. doi: 10.1016/j.resmic.2014.07.004.

- Jijon, S., Wetzel, A. y LeJeune, J.** (2007) «*Salmonella enterica* isolated from wildlife at two Ohio rehabilitation centers.», *Journal of zoo and wildlife medicine : official publication of the American Association of Zoo Veterinarians*, 38(3), pp. 409-413. doi: 10.1638/1042-7260(2007)38.
- Jones, F. S., Orcutt, M. y Little, R. B.** (1931) «Vibrios (*Vibrio jejuni*, n. sp.) associated with intestinal disorders of cows and calves», *The Journal of Experimental Medicine*, 53(6), pp. 853-864. doi: 10.1084/jem.53.6.853.
- De Jong, B., Andersson, Y. y Ekdahl, K.** (2005) «Effect of regulation and education on reptile-associated salmonellosis», *Emerging Infectious Diseases*, 11(3), pp. 398-403. doi: 10.3201/eid1103.040694.
- Jonsson, M. E., Chriel, M., Norstrom, M. y Hofshagen, M.** (2012) «Effect of climate and farm environment on *Campylobacter* spp. colonisation in Norwegian broiler flocks», *Preventive Veterinary Medicine*, 107(1-2), pp. 95-104. doi: 10.1016/j.prevetmed.2012.05.002.
- Jørgensen, J. C.** (2001) «*Salmonella* in the wild fauna, fur animals and pets in Denmark», en Raes, M. y Henken, A. (eds.) *Report on the sixth workshop organised by CRL-Salmonella*. Bilthoven: Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu RIVM
- de Juana, E. y Garcia, E.** (2015) *The birds of the Iberian Peninsula*. 1^a. Editado por Christopher Helm. London.
- Jung, K., Kim, Y., Lee, H. y Kim, J. T.** (2009) «*Aspergillus fumigatus* infection in two wild Eurasian black vultures (*Aegypius monachus Linnaeus*) with carbofuran insecticide poisoning: A case report», *Veterinary Journal*, 179(2), pp. 307-312. doi: 10.1016/j.tvjl.2007.09.004.
- Kalmbach, E. R.** (1939) «American vultures and the toxin of *Clostridium botulinum*», *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 94, pp. 187-191
- Kapperud, G., Espeland, G., Wahl, E., Walde, A., Herikstad, H., Gustavsen, S., Tveits, I., Natås, O., Bevanger, L. y Digranes, A.** (2003) «Factors associated with increased and decreased risk of *Campylobacter* infection: A prospective case-control study in Norway», *American Journal of Epidemiology*, 158(3), pp. 234-242. doi: 10.1093/aje/kwg139.
- Kapperud, G., Stenwig, H. y Lassen, J.** (1998) «Epidemiology of *Salmonella typhimurium* O:4-12 infection in Norway: evidence of transmission from an avian wildlife reservoir.», *American journal of epidemiology*, 147(8), pp. 774-782.
- Keller, J. I., Shriver, W. G., Waldenström, J., Griekspoor, P. y Olsen, B.** (2011) «Prevalence of *Campylobacter* in wild birds of the mid-Atlantic region, USA.», *Journal of Wildlife Diseases*, 47(3), pp. 750-754. doi: 10.7589/0090-3558-47.3.750.

- Kelterborn, E.** (1967) «*Salmonella* species. First isolations, names, and occurrence». W. Junk.
- Keymer, I.** (1972) «Diseases of birds of prey», *Veterinary Record*. BMJ Publishing Group Limited, 90(21), pp. 579-594. doi: 10.1136/vr.90.21.579.
- Khan, I. U. H., Gannon, V., Jokinen, C. C., Kent, R., Koning, W., Lapen, D. R., Medeiros, D., Miller, J., Neumann, N. F., Phillips, R., Schreier, H., Topp, E., van Bochove, E., Wilkes, G. y Edge, T. A.** (2014) «A national investigation of the prevalence and diversity of thermophilic *Campylobacter* species in agricultural watersheds in Canada», *Water Research*, 61, pp. 243-252. doi: 10.1016/j.watres.2014.05.027.
- Kingsley, R. A. y Bäumler, A. J.** (2000) «Host adaptation and the emergence of infectious disease: The *Salmonella* paradigm», *Molecular Microbiology*, pp. 1006-1014. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01907.x.
- Kirkpatrick, C. E. y Trexler-Myren, V. P.** (1986) «A survey of free-living falconiform birds for *Salmonella*», *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 189(9), pp. 997-998.
- Klančnik, A., Vučković, D., Plankl, M., Abram, M. y Smole Možina, S.** (2013) «In vivo modulation of *Campylobacter jejuni* virulence in response to environmental stress.», *Foodborne pathogens and disease*, 10(6), pp. 566-72. doi: 10.1089/fpd.2012.1298.
- Kocabiyik, A. L., Cangul, I. T., Alasonyalilar, A., Dedicova, D. y Karpiskova, R.** (2006) «Isolation of *Salmonella* Enteritidis phage type 21b from a Eurasian eagle-owl (*Bubo bubo*).», *Journal of wildlife diseases*, 42(3), pp. 696-8. doi: 10.7589/0090-3558-42.3.696.
- Komar, N.** (2003) «West Nile Virus: Epidemiology and Ecology in North America», *Advances in Virus Research*, 61, pp. 185-234. doi: 10.1016/S0065-3527(03)61005-5.
- König, C.** (1974) «On the behaviour of vultures on carcasses in Spain», *Journal of Ornithology*. Springer-Verlag, 115(3), pp. 289-320. doi: 10.1007/BF01644326.
- Koohmaraie, M., Scanga, J. a., De La Zerda, M. J., Koohmaraie, B., Tapay, L., Beskhlebnyaya, V., Mai, T., Greeson, K. y Samadpour, M.** (2012) «Tracking the Sources of *Salmonella* in Ground Beef Produced from Nonfed Cattle», *Journal of Food Protection*, 75(8), pp. 1464-1468. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-11-540.
- Kuiken, T., Leighton, F. A., Fouchier, R. A. M., LeDuc, J. W., Peiris, J. S. M., Schudel, A., Stöhr, K. y Osterhaus, A. D. M. E.** (2005) «Pathogen surveillance in animals.», *Science (New York, N.Y.)*. American Association for the Advancement of Science, 309(5741), pp. 1680-1. doi: 10.1126/science.1113310.

- Van Kuppeveld, F. J. M., Johansson, K. E., Galama, J. M. D., Kissing, J., Bolske, G., Van der Logt, J. T. M. y Melchers, W. J. G.** (1994) «Detection of mycoplasma contamination in cell cultures by a mycoplasma group-specific PCR», *Applied and Environmental Microbiology*, 60(1), pp. 149-152. doi: 0099-2240/94.
- Kušar, D., Pate, M., Mićunović, J., Bole-Hribovšek, V. y Ocepek, M.** (2010) «Detection of *Salmonella* in poultry faeces by molecular means in comparison to traditional bacteriological methods», *Slovenian Veterinary Research*, 47(2).
- Lafuente, S., Bellido, J. B., Moraga, F. A., Herrera, S., Yagüe, A., Montalvo, T., De Simó, M., Simón, P. y Caylà, J. A.** (2013) «*Salmonella* paratyphi B and *Salmonella* litchfield outbreaks associated with pet turtle exposure in Spain», *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(1), pp. 32-35. doi: 10.1016/j.eimc.2012.05.013.
- Lecis, R., Chessa, B., Cacciotto, C., Addis, M. F., Coradduzza, E., Berlinguer, F., Muzzeddu, M., Lierz, M., Carcangiu, L., Pittau, M. y Alberti, A.** (2010) «Identification and characterization of novel *Mycoplasma* spp. belonging to the hominis group from griffon vultures», *Research in Veterinary Science*, 89(1), pp. 58-64. doi: 10.1016/j.rvsc.2009.12.016.
- Lekuona, J. M. y Ursúa, C.** (2009) «Mortalidad de aves en parques eólicos de Navarra (Norte de España)», en De Lucas, M., Janss, G. F. E., y Ferrer, M. (eds.) *Aves y parques eólicos. Valoración del Riesgo y Atenuantes*. 1.^a ed. Quercus, pp. 187-202.
- Levy, S. B.** (2002) *The antibiotic paradox: how the misuse of antibiotics destroys their curative powers*. 2.^a. Perseus Publishing.
- Lierz, M., Hagen, N., Harcourt-Brown, N., Hernandez-Divers, S. J., Lüscho, D. y Hafez, H. M.** (2007) «Prevalence of mycoplasmas in eggs from birds of prey using culture and a genus-specific mycoplasma polymerase chain reaction.», *Avian Pathology*, 36(2), pp. 145-50. doi: 10.1080/03079450701213347.
- Lierz, M., Hagen, N., Hernandez-Divers, S. J. y Hafez, H. M.** (2008) «Occurrence of mycoplasmas in free-ranging birds of prey in Germany.», *Journal of Wildlife Diseases*, 44(4), pp. 845-50. doi: 10.7589/0090-3558-44.4.845.
- Literak, I., Vanko, R., Dolejska, M., Čížek, A. y Karpíšková, R.** (2007) «Antibiotic resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* in Russian rooks (*Corvus frugilegus*) wintering in the Czech Republic», *Letters in Applied Microbiology*, 45(6), pp. 616-621. doi: 10.1111/j.1472-765X.2007.02236.x.
- Lopez-Rull, I., Hornero-Mendez, D., Frías, O. y Blanco, G.** (2015) «Age-related relationships between innate immunity and plasma carotenoids in an obligate avian scavenger», *PLoS ONE*, 10(11). doi: 10.1371/journal.pone.0141759.
- López, B., Rivas, P., Toro, C., Trevisi, P. y Baquero, M.** (2012) «First case of

Salmonella salamae infection associated with consumption of reptile meat in humans», en *22nd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. London, p. 1578.

- Loria, G. R., Ferrantelli, E., Giardina, G., Vecchi, L. L., Sparacino, L., Oliveri, F., McAuliffe, L. y Nicholas, R. A. J.** (2008) «Isolation and characterization of unusual *Mycoplasma* spp. from captive Eurasian Griffon (*Gyps fulvus*) in Sicily.», *Journal of Wildlife Diseases*, 44(1), pp. 159-63. doi: 10.7589/0090-3558-44.1.159.
- Luber, P., Brynstad, S., Topsch, D., Scherer, K. y Bartelt, E.** (2006) «Quantification of *Campylobacter* species cross-contamination during handling of contaminated fresh chicken parts in kitchens», *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1), pp. 66-70. doi: 10.1128/AEM.72.1.66-70.2006.
- Lublin, A., Mechani, S., Siman-Tov, Y., Weisman, Y., Horowitz, H. I. y Hatzofe, O.** (2001) «Sudden Death of a Bearded Vulture (*Gypaetus barbatus*) Possibly Caused by Newcastle Disease Virus», *Avian Diseases*, 45(3), p. 741. doi: 10.2307/1592921.
- Mackey, B. M. y Derrick, C. M.** (1979) «Contamination of the Deep Tissues of Carcasses by Bacteria Present on the Slaughter Instruments or in the Gut», *Journal of Applied Bacteriology*. Blackwell Publishing Ltd, 46(2), pp. 355-366. doi: 10.1111/j.1365-2672.1979.tb00832.x.
- Marcus, R., Varma, J. K., Medus, C., Boothe, E. J., Anderson, B. J., Crume, T., Fullerton, K. E., Moore, M. R., White, P. L., Lyskowicz, E., Voetsch, A. C. y Angulo, F. J.** (2007) «Re-assessment of risk factors for sporadic *Salmonella* serotype Enteritidis infections: a case-control study in five FoodNet Sites, 2002–2003», *Epidemiology and Infection*. Cambridge University Press, 135(1), p. 84. doi: 10.1017/S0950268806006558.
- Margalida, A., Sánchez-Zapata, J. A., Blanco, G., Hiraldo, F. y Donázar, J. A.** (2014) «Diclofenac Approval as a Threat to Spanish Vultures», *Conservation Biology*, pp. 631-632. doi: 10.1111/cobi.12271.
- Marin, C., Hernandez, A. y Lainez, M.** (2009) «Biofilm development capacity of *Salmonella* strains isolated in poultry risk factors and their resistance against disinfectants.», *Poultry science*, 88(2), pp. 424-431. doi: 10.3382/ps.2008-00241.
- Marin, C. y Lainez, M.** (2009) «*Salmonella* detection in feces during broiler rearing and after live transport to the slaughterhouse.», *Poultry science*, 88(9), pp. 1999-2005. doi: 10.3382/ps.2009-00040.
- Marin, C., Ingesa-Capaccioni, S., González-Bodi, S., Marco-Jiménez, F. y Vega, S.** (2013) «Free-Living Turtles Are a Reservoir for *Salmonella* but Not for *Campylobacter*», *PLoS ONE*, 8(8). doi: 10.1371/journal.pone.0072350.
- Martín, M. P.** (2006) «Diversidad y distribución de las especies de mallophaga

(insecta) en aves y mamíferos de la comunidad de Madrid», *Graellsia*, p. 62: 21-32

Martínez-Abraín, A., Tavecchia, G., Regan, H. M., Jiménez, J., Surroca, M. y Oro, D. (2012) «Effects of wind farms and food scarcity on a large scavenging bird species following an epidemic of bovine spongiform encephalopathy», *Journal of Applied Ecology*, 49(1), pp. 109-117. doi: 10.1111/j.1365-2664.2011.02080.x.

Martínez De Lecea, F., Hernando, A., Illana, A. y Echegaray, J. (2011) «Cannibalism in Eurasian Griffon Vultures *Gyps fulvus*», *ARDEA*, 99(99), pp. 240-242.

Mateache, P. (2003) *Base de Datos de la Biodiversidad. Conselleria de Agricultura, Medio Ambiente, Cambio Climatico y Desarrollo Rural*. Disponible en: <http://bdb.cma.gva.es/ficha.asp?id=12357>.

McFadyean, J. y Stockman, S. (1913) «Part III, Abortion in sheep», en *Report of the Departmental Committee appointed by the Board of Agriculture and Fisheries to inquire into epizootic abortion*. London [England]: Printed under the authority of H.M.S.O. by Eyre and Spottiswoode.

McKinley, G. A., Fagerberg, D. J., Quarles, C. L., George, B. A., Wagner, D. E. y Rollins, L. D. (1980) «Incidence of salmonellae in fecal samples of production swine and swine at slaughter plants in the United States in 1978», *Applied and Environmental Microbiology*, 40(3), pp. 562-566.

Meneses, Y. (2010) *Identification and Characterization of Salmonella Serotypes Isolated from Pork and Poultry from Commercial Sources, Dissertations & Theses in Food Science and Technology*. University of Nebraska - Lincoln.

Merino, S., Peirce, M. A., Fernández, M. y Lanzarot, P. (2002) «Redescription of *Babesia moshkovskii* (Schurenkova) from the griffon vulture *Gyps fulvus* (Hablizl)», *Journal of Natural History*, 36(14), pp. 1635-1638. doi: 10.1080/00222930110097653.

Mermin, J., Hutwagner, L., Vugia, D., Shallow, S., Daily, P., Bender, J., Koehler, J., Marcus, R., Angulo, F. J. y Emerging Infections Program FoodNet Working Group (2004) «Reptiles, amphibians, and human *Salmonella* infection: a population-based, case-control study.», *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 38 Suppl 3(Suppl 3), pp. S253-61. doi: 10.1086/381594.

Meyer, C., Thiel, S., Ullrich, U. y Stolle, A. (2010) «*Salmonella* in raw meat and by-products from pork and beef.», *Journal of food protection*, 73(10), pp. 1780-1784.

Miles, R. y Nicholas, R. (eds.) (1998) «introduction», en *Methods in Molecular Biology, vol. 104: Mycoplasma Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, pp. 1-5

- Millan, J., Aduriz, G., Moreno, B., Juste, R. A. y Barral, M.** (2004) «Salmonella isolates from wild birds and mammals in the Basque Country (Spain)», *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 23(3), pp. 905-911. doi: 10.20506/rst.23.3.1529.
- Mohiuddin, S. M.** (2007) *Infectious Diseases of Domestic Animals*. IBDC Publishers, Lucknow.
- Molbak, K.** (2004) «Spread of Resistant Bacteria and Resistance Genes from Animals to Humans - The Public Health Consequences», *Journal of Veterinary Medicine Series B*. Blackwell Verlag GmbH, 51(8-9), pp. 364-369. doi: 10.1111/j.1439-0450.2004.00788.x.
- Molina-Lopez, R. A., Obon, E., Valverdú, N., Martin, M., Mateu, E., Darwich, L. y Cerdà-Cuellar, M.** (2011) «Wild raptors as carriers of antimicrobial-resistant Salmonella and Campylobacter strains», *Veterinary Record*, 168(21), p. 565. doi: 10.1136/vr.c7123.
- Mora, A., Ortega, N., Garcia, E., Viso, S., Candela, M. G., Dahbi, G., Cuello, F. y Caro, M. R.** (2014) «First Characterization of Escherichia coli Strains Isolated from Wildlife griffon vulture (*Gyps fulvus*) in the Southeast of Spain», *Open Journal of Veterinary Medicine*. Scientific Research Publishing, 4(12), pp. 329-333. doi: 10.4236/ojvm.2014.412040.
- del Moral, J. y Marti, R. (eds.)** (2001) *EL Buitre Leonado en la Península Ibérica III*. SEO BirdLife.
- del Moral, J.** (2009) *El buitre leonado en España. Población reproductora en 2008 y método de censo*. Editado por J. Del Moral y SEO BirdLife.
- Mori, M., Kuwabara, S. y Yuki, N.** (2012) «Fisher syndrome: clinical features, immunopathogenesis and management.», *Expert review of neurotherapeutics*, 12(1), pp. 39-51. doi: 10.1586/ern.11.182.
- Morishita, T. Y., Aye, P. P. y Brooks, D. L.** (1997) «A Survey of Diseases of Raptorial Birds», *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 11(2), pp. 77-92.
- Mörner, T.** (2001) «Salmonellosis», en Williams, E. S. y Barker, I. K. (eds.) *Infectious diseases of wild mammals*. 3^a. Iowa State University Press / Ames, pp. 505-506.
- Mourand, G., Jouy, E., Bougeard, S., Dheilly, A., Kerouanton, A., Zeitouni, S. y Kempf, I.** (2014) «Experimental study of the impact of antimicrobial treatments on *Campylobacter*, *Enterococcus* and PCR-capillary electrophoresis single-strand conformation polymorphism profiles of the gut microbiota of chickens», *Journal of Medical Microbiology*, 63, pp. 1552-1560. doi: 10.1099/jmm.0.074476-0.
- Mozos, E., Hervas, J., Moyano, T., Diaz, J. y Gomez-Villamandos, J. C.** (1994)

- «Inclusion body disease in a peregrine falcon (*Falco peregrinus*): histological and ultrastructural study», *Avian Pathology*. Taylor & Francis Group, 23, pp. 175-181. doi: 10.1080/03079459408418986.
- Muntaner, J.** (2012) «El voltor lleonat, nova especie nidificant a les Balears», *Es busqueret*, p. 30: 8-12
- Nakadai, A., Kuroki, T., Kato, Y., Suzuki, R., Yamai, S., Yaginuma, C., Shiotani, R., Yamanouchi, A. y Hayashidani, H.** (2005) «Prevalence of *Salmonella* spp. in pet reptiles in Japan.», *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 67, pp. 97-101. doi: 10.1292/jvms.67.97.
- Newell, D. G., Elvers, K. T., Dopfer, D., Hansson, I., Jones, P., James, S., Gittins, J., Stern, N. J., Davies, R., Connerton, I., Pearson, D., Salvat, G. S. y Allen, V. M.** (2011) «Biosecurity-based interventions and strategies to reduce *Campylobacter* spp. on poultry farms», *Applied and Environmental Microbiology*, 77(24), pp. 8605-8614. doi: 10.1128/AEM.01090-10.
- Nicolet, J.** (1996) «Animal mycoplasmoses: a general introduction.», *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 15(4), pp. 1233-40.
- Norusis, M.** (2008) *SPSS 16.0 Statistical Procedures Companion*. 2.^a ed. New Jersey, EEUU: Prentice Hall Press Upper Saddle River.
- Nou, X., Rivera-Betancourt, M., Bosilevac, J. M., Wheeler, T. L., Shackelford, S. D., Gwartney, B. L., Reagan, J. O. y Koochmariaie, M.** (2003) «Effect of Chemical Dehairing on the Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 and the Levels of Aerobic Bacteria and Enterobacteriaceae on Carcasses in a Commercial Beef Processing Plant», *Journal of Food Protection*, 66(11), pp. 2005-2009.
- O'Brien, T. F.** (2002) «Emergence, Spread, and Environmental Effect of Antimicrobial Resistance: How Use of an Antimicrobial Anywhere Can Increase Resistance to Any Antimicrobial Anywhere Else», *Clinical Infectious Diseases*. Oxford University Press, 34(s3), pp. S78-S84. doi: 10.1086/340244.
- Oaks, J. L., Donahoe, S. L., Rurangirwa, F. R., Rideout, B. A., Gilbert, M. y Virani, M. Z.** (2004) «Identification of a novel mycoplasma species from an Oriental white-backed vulture (*Gyps bengalensis*).», *Journal of clinical microbiology*, 42(12), pp. 5909-12. doi: 10.1128/JCM.42.12.5909-5912.2004.
- Oaks, J. L., Meteyer, C. U., Rideout, B. A., Shivaprasad, H. L., Gilbert, M., Virani, M., Watson, R. T. y Khan, A. A.** (2004) «Diagnostic Investigation of Vulture Mortality: the Anti-Inflammatory Drug Diclofenac is associated with Visceral Gout», en Meyburg, B. U. y Chancellot, R. D. (eds.) *Raptor worldwide. Proceedings of the 6th world conference on birds of prey and owls*. Budapest: W.W.G.B.P. The World Working Group on Birds of Prey and Owl, pp. 241-243.
- Obukhovska, O.** (2013) «The Natural Reservoirs of *Salmonella* Enteritidis in

Populations of Wild Birds», *Online Journal of Public Health Informatics*, 5(1). doi: 10.5210/ojphi.v5i1.4569.

Olson, C. K., Ethelberg, S., van Pelt, W. y Tauxe, R. V. (2008) «Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in industrialized nations», en Blaser, M. J., Nachamkin, I., y Szymanski, C. M. (eds.) *Campylobacter*. 3.^a ed. Washington DC: American Society of Microbiology, pp. 163-164. doi: 10.1128/9781555815554.

OMS (2005) *Drug-resistant Salmonella. Fact sheet N° 139*. Genova.

OMS (2011) *Campylobacter*. OMS (Organización Mundial de la Salud). Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs255/es/> (Accedido: 31 de agosto de 2016).

Oña, A., Martínez, J., Van Den Berg, T., Casal, I., Negro, J. J. y Rodríguez, J. F. (2000) «Epidemiological survey of infectious bursal disease virus in wild birds», en *Proceedings, 4th Meeting of the European Wildlife Disease Association, Zaragoza, September 2000*. Zaragoza: EWDA (European Wildlife Disease Association), p. 39.

Ortega, N., Apaza, D., Gonzalez, F., Salinas, J. y Caro, M. R. (2012) «Occurrence of *Chlamydiaceae* in non-symptomatic free-living raptors in Spain», *European Journal of Wildlife Research*, 58(1), pp. 351-355. doi: 10.1007/s10344-011-0538-6.

Ostfeld, R. S. y Keesing, F. (2000) «Biodiversity series: The function of biodiversity in the ecology of vector-borne zoonotic diseases», *Canadian Journal of Zoology*, 78, pp. 2061-2078. doi: 10.1139/z00-172.

Padungtod, P. y Kaneene, J. B. (2006) «Salmonella in food animals and humans in northern Thailand», *International Journal of Food Microbiology*, 108(3), pp. 346-354. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.020.

Palmgren, H., Broman, T., Waldenström, J., Lindberg, P., Aspán, A. y Olsen, B. (2004) «*Salmonella* Amager, *Campylobacter jejuni*, and urease-positive thermophilic *Campylobacter* found in free-flying peregrine falcons (*Falco peregrinus*) in Sweden.», *Journal of wildlife diseases*, 40(3), pp. 583-587. doi: 10.7589/0090-3558-40.3.583.

Patrick, M. E., Gilbert, M. J., Blaser, M. J., Tauxe, R. V., Wagenaar, J. A. y Fitzgerald, C. (2013) «Human infections with new subspecies of *Campylobacter fetus*», *Emerging Infectious Diseases*, 19(10), pp. 1678-1680. doi: 10.3201/eid1910.130883.

Pérez, J. M. y Palma, R. L. (2000) «First records of species of the genus *Nosopon* Hopkins, 1950 (Phthiraptera: Menoponidae) in Spain», *Research alld lieviell's ill Parasitology*, 58(2), pp. 145-148.

- Petersen, L., Nielsen, E. M., Engberg, J., On, S. L. W. y Dietz, H. H.** (2001) «Comparison of Genotypes and Serotypes of *Campylobacter jejuni* Isolated from Danish Wild Mammals and Birds and from Broiler Flocks and Humans», *Applied and Environmental Microbiology*, 67(7), pp. 3115-3121. doi: 10.1128/AEM.67.7.3115-3121.2001.
- Pettersson, B., Leitner, T., Ronaghi, M., Bölske, G., Uhlen, M. y Johansson, K. E.** (1996) «Phylogeny of the *Mycoplasma mycoides* cluster as determined by sequence analysis of the 16S rRNA genes from the two rRNA operons.», *Journal of bacteriology. American Society for Microbiology*, 178(14), pp. 4131-42. doi: 10.1128/JB.178.14.4131-4142.1996.
- Pezzoli, L., Elson, R., Elson@hpa, R. O., Little, C., Fisher, I., Yip, H., Peters, T., Hampton, M., De Pinna, E., Coia, J., Mather, H., Brown, D., Nielsen, E. M., Ethelberg, S., Heck, M., De Jager, C. y Threlfall, J.** (2007) «International outbreak of *Salmonella* Senftenberg in 2007», *Eurosurveillance*, 12(24).
- Podolak, R., Enache, E., Stone, W., Black, D. G. y Elliott, P. H.** (2010) «Sources and Risk Factors for Contamination, Survival, Persistence, and Heat Resistance of *Salmonella* in Low-Moisture Foods», *Journal of Food Protection*, 73(10), pp. 1919-1936
- Porrero, M. C., Mentaberre, G., Sánchez, S., Fernández-Llario, P., Casas-Díaz, E., Mateos, A., Vidal, D., Lavín, S., Fernández-Garayzábal, J. F. y Domínguez, L.** (2014) «Carriage of *Staphylococcus aureus* by free-living wild animals in Spain», *Applied and Environmental Microbiology*, 80(16), pp. 4865-4870. doi: 10.1128/AEM.00647-14.
- Pouillot, R., Garin, B., Ravaonindrina, N., Diop, K., Ratsitorahina, M., Ramanantsoa, D. y Rocourt, J.** (2012) «A Risk Assessment of *Campylobacteriosis* and *Salmonellosis* Linked to Chicken Meals Prepared in Households in Dakar, Senegal», *Risk Analysis*. Blackwell Publishing Inc, 32(10), pp. 1798-1819. doi: 10.1111/j.1539-6924.2012.01796.x.
- Poveda, J. B.** (1988) *Estudio epizootiológico de infecciones por microorganismos del género Mycoplasma en aves*. Universidad de Cordoba. Facultad de Veterinaria.
- Poveda, J. B., Giebel, J., Kirchhoff, H. y Fernandez, A.** (1990a) «Isolation of mycoplasmas from a buzzard, falcons and vultures.», *Avian pathology: journal of the W.V.P.A*, 19(4), pp. 779-83. doi: 10.1080/03079459008418729.
- Poveda, J. B., Carranza, J., Miranda, A., Garrido, A., Hermoso, M., Fernandez, A. y Domenech, J.** (1990b) «An epizootiological study of avian *Mycoplasmas* in southern Spain.», *Avian pathology: journal of the W.V.P.A*, 19(4), pp. 627-633. doi: 10.1080/03079459008418718.
- Poveda, J. B., Giebel, J., Flossdorf, J., Meier, J. y Kirchhoff, H.** (1994) «*Mycoplasma buteonis* sp. nov., *Mycoplasma falconis* sp. nov., and *Mycoplasma*

- gypis* sp. nov., three species from birds of prey», *International Journal of Medical Microbiology*, (Jan.), pp. 94-98.
- Poveda, J. B.** (1998) «Biochemical Characteristics in *Mycoplasma* Identification», en *Mycoplasma Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, pp. 69-78. doi: 10.1385/0-89603-525-5:69.
- Poveda, J. B., Ramírez, A. S., De la Fe, C., Assuncáo, P. y Díaz-Bertrana, L.** (2002) «Mycoplasmas», en Vadillo, S. M., Píriz, S. D., y Mateos, E. M. Y. (eds.) *Manual de Microbiología*. Madrid: McGraw-Hill. Interamericana, pp. 423-430.
- Van Putten, J. P. M., Van Alphen, L. B., Wösten, M. M. S. M. y De Zoete, M. R.** (2009) «Molecular mechanisms of *Campylobacter* infection», *Current Topics in Microbiology and Immunology*, pp. 197-229. doi: 10.1007/978-3-642-01846-6-7.
- Rajabally, Y. a, Durand, M.-C., Mitchell, J., Orlikowski, D. y Nicolas, G.** (2014) «Electrophysiological diagnosis of Guillain-Barre syndrome subtype: could a single study suffice?», *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, pp. 1-5. doi: 10.1136/jnnp-2014-307815.
- Ramesh, N., Joseph, S. W., Carr, L. E., Douglass, L. W. y Wheaton, F. W.** (2002) «Evaluation of chemical disinfectants for the elimination of *Salmonella* biofilms from poultry transport containers.», *Poultry science*. Oxford University Press, 81(6), pp. 904-10. doi: 10.1093/PS/81.6.904.
- Ramírez, A. S., Naylor, C. J., Pitcher, D. G. y Bradbury, J. M.** (2008) «High inter-species and low intra-species variation in 16S-23S rDNA spacer sequences of pathogenic avian mycoplasmas offers potential use as a diagnostic tool», *Veterinary Microbiology*, 128(3-4), pp. 279-287. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.10.023.
- Ramis, A., Majo, N., Pumarola, M., Fondevila, D. y Ferrer, L.** (1994) «*Herpesvirus* Hepatitis In 2 Eagles In Spain», *Avian Diseases*, 38(1), pp. 197-200.
- Reche, M. P., Jiménez, P. A., Alvarez, F., García De Los Ríos, J. E., Rojas, A. M. y De Pedro, P.** (2003) «Incidence of *Salmonellae* in captive and wild free-living raptorial birds in Central Spain», *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 50(1), pp. 42-44. doi: 10.1046/j.1439-0450.2003.00623.x.
- Rechenburg, A. y Kistemann, T.** (2009) «Sewage effluent as a source of *Campylobacter* sp. in a surface water catchment», *International Journal of Environmental Health Research*, 19(4), pp. 239-249. doi: 10.1080/09603120802460376.
- Refsum, T., Handeland, K., Baggesen, D. L., Holstad, G. y Kapperud, G.** (2002) «*Salmonellae* in avian wildlife in Norway from 1969 to 2000», *Applied and Environmental Microbiology*, 68(11), pp. 5595-5599. doi: 10.1128/AEM.68.11.5595-5599.2002.

- Rodrigues, E. C., Souza, M. C., Toledo, S. S., Barbosa, C. G., Reis, E. M., Rodrigues, D. P. y Lazaro, N. S.** (2011) «Effects of gamma irradiation on the viability and phenotypic characteristics of *Salmonella* enteritidis inoculated into specific-pathogen-free eggs», *J Food Prot*, 74(12), pp. 2031-2038. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-11-086.
- Rose, N., Beaudreau, F., Drouin, P., Toux, J. Y., Rose, V. y Colin, P.** (2000) «Risk factors for *Salmonella* persistence after cleansing and disinfection in French broiler-chicken houses», *Preventive Veterinary Medicine*, 44(1-2), pp. 9-20. doi: 10.1016/S0167-5877(00)00100-8.
- Rosenquist, H., Sommer, H. M., Nielsen, N. L. y Christensen, B. B.** (2006) «The effect of slaughter operations on the contamination of chicken carcasses with thermotolerant *Campylobacter*», *International Journal of Food Microbiology*, 108(2), pp. 226-232. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.12.007.
- Ruder, M. G., Feldman, S. H., Wünschmann, A. y McRuer, D. L.** (2009) «Association of *Mycoplasma corogypsi* and polyarthritis in a black vulture (*Coragyps atratus*) in Virginia.», *Journal of wildlife diseases*, 45(3), pp. 808-16. doi: 10.7589/0090-3558-45.3.808.
- Russell, S. M.** (1998) «Chemical Sanitizing Agents and Spoilage Bacteria on Fresh Broiler Carcasses», *The Journal of Applied Poultry Research*. Oxford University Press, 7(3), pp. 273-280. doi: 10.1093/japr/7.3.273.
- Salvador, A.** (2016) Buitre Leonado-Gyps fulvus, *Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles*. Disponible en: <http://www.vertebradosibericos.org/aves/gypful.html> (Accedido: 31 de agosto de 2016).
- Santana, E. S., Andrade, M. A., Rocha, T. M., Stringhini, J. H., Café, M. B., Jayme, V. de S., Barnabé, A. C. de S. y Alcântara, J. B. de** (2012) «Performance of broilers experimentally inoculated with *Salmonella* Typhimurium and fed diets with addition of lactulosis», *Revista Brasileira de Zootecnia*. Sociedade Brasileira de Zootecnia, 41(8), pp. 1884-1889. doi: 10.1590/S1516-35982012000800012.
- Sarkar, S. R., Hossain, M. A., Paul, S. K., Ray, N. C., Sultana, S., Rahman, M. M. y Islam, A.** (2014) «Campylobacteriosis - an overview.», *Mymensingh medical journal: MMJ*, 23(1), pp. 173-180.
- Sarmah, A. K., Meyer, M. T. y Boxall, A. B. A.** (2006) «A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment», *Chemosphere*, 65(5), pp. 725-759. doi: 10.1016/j.chemosphere.2006.03.026.
- Scherer, K., Szabó, I., Rösler, U., Appel, B., Hensel, A. y Nöckler, K.** (2008) «Time course of infection with *Salmonella* typhimurium and its influence on fecal

shedding, distribution in inner organs, and antibody response in fattening pigs», *Journal of Food Protection*, 71(4), pp. 699-705.

Schettler, E., Langgemach, T., Sömmer, P., Streich, J. y Frölich, K. (2001) «Seroepizootiology of selected infectious disease agents in free-living birds of prey in Germany.», *Journal of wildlife diseases*, 37(1), pp. 145-152. doi: 10.7589/0090-3558-37.1.145.

Sebald, M. y Veron, M. (1963) «Base DNA content and classification of vibrios», *Annales de l'Institut Pasteur*, 105, pp. 897-910

SENB (2012) *Informe sobre el uso ilegal de cebos envenenados en el Medio Natural 2011*. Valencia: Servicio de Espacios Naturales y Biodiversidad.

Shah, J., Desai, P. T., Chen, D., Stevens, J. R. y Weimer, B. C. (2013) «Preadaptation to cold stress in *Salmonella enterica* serovar typhimurium increases survival during subsequent acid stress exposure», *Applied and Environmental Microbiology*, 79(23), pp. 7281-7289. doi: 10.1128/AEM.02621-13.

Shulman, S. T. y Moel, D. (1983) «Campylobacter infection.», *Pediatrics*. American Academy of Pediatrics, 72(3), p. 437

Shultz, S., Baral, H. S., Charman, S., Cunningham, A. a, Das, D., Ghalsasi, G. R., Goudar, M. S., Green, R. E., Jones, A., Nighot, P., Pain, D. J. y Prakash, V. (2004) «Diclofenac poisoning is widespread in declining vulture populations across the Indian subcontinent.», *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 271 Suppl(table 1), pp. S458-S460. doi: 10.1098/rsbl.2004.0223.

Silva, J., Leite, D., Fernandes, M., Mena, C., Gibbs, P. A. y Teixeira, P. (2011) «Campylobacter spp. As a foodborne pathogen: A review», *Frontiers in Microbiology*. doi: 10.3389/fmicb.2011.00200.

Skirrow, M. B. y Blaser, M. J. (1992) «Clinical and epidemiologic considerations», en Nachamkin, I., Blaser, M. J., y Tompkins, L. S. (eds.) *Campylobacter jejuni: current status and future trends*. 2.^a ed. Washington DC: American Society for Microbiology, pp. 3-8.

Skirrow, M. B. y Blaser, M. J. (2000) «Clinical aspects of *Campylobacter*», en Nachamkin, I. y Blaser, M. J. (eds.) *Campylobacter*. 2.^a ed. Washington DC: American Society for Microbiology, pp. 69-88.

Slader, J., Domingue, G., Jørgensen, F., McAlpine, K., Owen, R. J., Bolton, F. J. y Humphrey, T. J. (2002) «Impact of transport crate reuse and of catching and processing on *Campylobacter* and *Salmonella* contamination of broiler chickens», *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2), pp. 713-719. doi: 10.1128/AEM.68.2.713-719.2002.

- Slotta-Bachmayr, L., Böge, L. R. y Camiña, A.** (2004) *The Eurasian Griffon Vulture (Gyps fulvus) in Europe and the Mediterranean*. Editado por L. Slotta-Bachmayr, L. R. Böge, y Á. Camiña Cardenal. Salzburg: EGVWG (East European / Mediterranean Griffon Vulture Working Group).
- Southern, K. J., Rasekh, J. G., Hemphill, F. E. y Thaler, A. M.** (2006) «Conditions of transfer and quality of food.», *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 25(2), pp. 675-684.
- Spiegel, O., Harel, R., Getz, W. M. y Nathan, R.** (2013) «Mixed strategies of griffon vultures' (*Gyps fulvus*) response to food deprivation lead to a hump-shaped movement pattern», *Movement Ecology*, 1(1), p. 5. doi: 10.1186/2051-3933-1-5.
- Stepan, R. M., Sherwood, J. S., Petermann, S. R. y Logue, C. M.** (2011) «Molecular and comparative analysis of *Salmonella enterica* Senftenberg from humans and animals using PFGE, MLST and NARMS», *BMC Microbiology*. BioMed Central, 11(1), p. 153. doi: 10.1186/1471-2180-11-153.
- Suárez-Pérez, A., Ramírez, A. S., Rosales, R. S., Calabuig, P., Poveda, C., Rosselló-Móra, R., Nicholas, R. A. J. y Poveda, J. B.** (2012) «*Mycoplasma neophronis* sp. nov., isolated from the upper respiratory tract of Canarian Egyptian vultures (*Neophron percnopterus majorensis*)», *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(6), pp. 1321-1325. doi: 10.1099/ijs.0.033803-0.
- Sulston, J., Mallett, F., Staden, R., Durbin, R., Horsnell, T. y Coulson, A.** (1988) «Software for genome mapping by fingerprinting techniques», *Bioinformatics*. Oxford University Press, 4(1), pp. 125-132. doi: 10.1093/bioinformatics/4.1.125.
- SVS** (2013) *Memoria del plan de acción contra el uso ilegal del veneno en el medio natural en la Comunidad Valenciana 2012*. Valencia: Servicio de Vida Silvestre.
- SVS** (2014) *Memoria del plan de acción contra el uso ilegal del veneno en el medio natural en la Comunidad Valenciana 2013*. Valencia: Servicio de Vida Silvestre.
- SVS** (2015a) *Evolución de la población de aves necrófagas en la comunitat valenciana. Censo 2015*. Valencia: Servicio de Vida Silvestre.
- SVS** (2015b) *Memoria del plan de acción contra el uso ilegal del veneno en el medio natural en la Comunidad Valenciana 2014*. Valencia: Servicio de Vida Silvestre.
- SVS** (2016) *Informe sobre alimentación de aves necrófagas en la Comunitat Valenciana 2015*. Valencia: Servicio de Vida Silvestre.
- Swanson, S. J., Snider, C., Braden, C. R., Boxrud, D., Wünschmann, A., Rudroff, J. A., Lockett, J. y Smith, K. E.** (2007) «Multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium associated with pet rodents.», *The New England Journal of Medicine*, 356(1), pp. 21-28. doi: 10.1056/NEJMoa060465.

- Swartz, M. N.** (2002) «Human diseases caused by foodborne pathogens of animal origin.», *Clinical infectious diseases*, 34(Suppl 3), pp. S111-S122. doi: 10.1086/340248.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. y Kumar, S.** (2013) «MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0», *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), pp. 2725-2729. doi: 10.1093/molbev/mst197.
- Tauni, M. A. y Osterlund, A.** (2000) «Outbreak of *Salmonella* Typhimurium in cats and humans associated with infection in wild birds», *J Small Animal Practice*, 41(8), pp. 339-341.
- Terrasse, J. F. y Terrasse, M.** (1974) «Comportement de quelques Rapaces nécrophages dans les Pyrénées», *Nos Oiseaux*, p. 356: 289-299.
- Thiollay, J. M.** (1994) «Family Accipitridae (Hawks and Eagles)», en Hoyo, J. del, Elliott, A., y Sargatal, J. (eds.) *Handbook of the birds of the world, New World Vultures to Guinea-fowl*. Lynx Edicions, pp. 52-205.
- Tola, S., Angioi, A., Rocchigiani, A. M., Idini, G., Manunta, D., Galleri, G. y Leori, G.** (1997) «Detection of *Mycoplasma agalactiae* in sheep milk samples by polymerase chain reaction.», *Veterinary microbiology*, 54(1), pp. 17-22. doi: 10.1016/S0378-1135(96)01269-2.
- IUCN** (2016) *The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2016-2*. Disponible en: <http://www.iucnredlist.org/search>.
- Usera, M. A., Aladueña, A., Díez, R., De la Fuente, M., Cerdán, P., Gutiérrez, R. y Echeita, A.** (2001) *Análisis de las cepas de Salmonella spp. aisladas de muestras de origen no humano en España en el año 2000*, *Boletín Epidemiológico semanal*.
- Vela, A. I., Casas-Díaz, E., Fernández-Garayzábal, J. F., Serrano, E., Agustí, S., Porrero, M. C., Sánchez del Rey, V., Marco, I., Lavín, S. y Domínguez, L.** (2015) «Estimation of Cultivable Bacterial Diversity in the Cloacae and Pharynx in Eurasian Griffon Vultures (*Gyps fulvus*)», *Microbial Ecology*, 69(3), pp. 597-607. doi: 10.1007/s00248-014-0513-3.
- Versalovic, J., Koeuth, T. y Lupski, R.** (1991) «Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes», *Nucleic Acids Research*, 19(24), pp. 6823-6831. doi: 10.1093/nar/19.24.6823.
- Vestby, L. K., Lönn-Stensrud, J., Møretro, T., Langsrud, S., Aamdal-Scheie, A., Benneche, T. y Nesse, L. L.** (2010) «A synthetic furanone potentiates the effect of disinfectants on *Salmonella* in biofilm», *Journal of Applied Microbiology*, 108(3), pp. 771-778. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04495.x.
- Vicente, J., León-Vizcaíno, L., Gortázar, C., Cubero, M. J., González-Candela, M.**

- y Martín-Atance, P.** (2002) «Antibodies to selected viral and bacterial pathogens in European wild boars from southcentral Spain.», *Journal of wildlife diseases*, 38(3), pp. 649-652. doi: 10.7589/0090-3558-38.3.649.
- Waldenström, J., Broman, T., Carlsson, I., Hasselquist, D., Achterberg, R. P., Wagenaar, J. A. y Olsen, B.** (2002) «Prevalence of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, and *Campylobacter coli* in different ecological guilds and taxa of migrating birds», *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), pp. 5911-5917. doi: 10.1128/AEM.68.12.5911-5917.2002.
- Waldenström, J., Axelsson-Olsson, D., Olsen, B., Hasselquist, D., Griekspoor, P., Jansson, L., Teneberg, S., Svensson, L. y Ellström, P.** (2010) «*Campylobacter jejuni* colonization in wild birds: Results from an infection experiment», *PLoS ONE*, 5(2). doi: 10.1371/journal.pone.0009082.
- Wales, A., Weaver, J., McLaren, I. M., Smith, R. P., Mueller-Doblies, D. y Davies, R. H.** (2013) «Investigation of the Distribution of Salmonella within an Integrated Pig Breeding and Production Organisation in the United Kingdom.», *ISRN veterinary science*, 2013, p. 943126. doi: 10.1155/2013/943126.
- Weber, T. P. y Stilianakis, N. I.** (2008) «Migratory birds, the H5N1 influenza virus and the scientific method.», *Virology journal*, 5, p. 57. doi: 10.1186/1743-422X-5-57.
- Whiley, H., van den Akker, B., Giglio, S. y Bentham, R.** (2013) «The role of environmental reservoirs in human campylobacteriosis», *International Journal of Environmental Research and Public Health*, pp. 5886-5907. doi: 10.3390/ijerph10115886.
- Whitcomb, R. F.** (1983) «Culture media for *spiroplasmas*», en Samuel Razin (ed.) *Methods in Mycoplasmaology V1: Mycoplasma Characterization*, pp. 47-159.
- Willis, I.** (1994) «plate 7, Accipitridae V, (Gypohierax, Gypaetus, Neophron, Necrosyrtes, Gyps, Aegyptius, Torgos, Trigonoceps, Sarcogyps)», en Hoyo, J. del, Elliott, A., y Sargatal, J. (eds.) *Handbook of the birds of the world, New World Vultures to Guinea-fowl*. Lynx Edicions.
- Wilson, J. E. y MacDonald, J. W.** (1967) «Salmonella infection in wild birds», *British Veterinary Journal*, 123(5), pp. 212-218.
- Winsor, D. K., Bloebaum, A. P. y Mathewson, J. J.** (1981) «Gram-negative, aerobic, enteric pathogens among intestinal microflora of wild turkey vultures (*Cathartes aura*) in West Central Texas», *Applied and Environmental Microbiology*, 42(6), pp. 1123-1124.
- Winter, D., Spargser, J., Höfle, U. Z. y Rosengarten, R.** (2003) «*Mycoplasma buteonis* and unclassified mycoplasmas associated with conjunctivitis, sinusitis, air sac lesions and fatal septicemia in free-ranging and captive wild birds», en

Wissenschaftliches Programm 55. DGHM-Tagung, p. 404.

- Yogasundram, K., Shane, S. M. y Harrington, K. S.** (1989) «Prevalence of *Campylobacter jejuni* in selected domestic and wild birds in Louisiana.», *Avian diseases*, 33(4), pp. 664-667. doi: Doi 10.2307/1591142.
- Zautner, A. E., Johann, C., Strubel, A., Busse, C., Tareen, A. M., Masanta, W. O., Lugert, R., Schmidt-Ott, R. y Grob, U.** (2014) «Seroprevalence of campylobacteriosis and relevant post-infectious sequelae», *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 33(6), pp. 1019-1027. doi: 10.1007/s10096-013-2040-4.
- Zbrun, M. V, Romero-Scharpen, A., Olivero, C., Rossler, E., Soto, L. P., Rosmini, M. R., Sequeira, G. J., Signorini, M. L. y Frizzo, L. S.** (2013) «Occurrence of thermotolerant *Campylobacter* spp. at different stages of the poultry meat supply chain in Argentina», *New Zealand Veterinary Journal*, 61(6), pp. 337-343. doi: Doi 10.1080/00480169.2013.817294.
- Zeinali, T., Khanzadi, S., Jamshidi, A. y Azizzadeh, M.** (2012) «Growth response of *Salmonella typhimurium* as a function of temperature, pH, organic and inorganic acids, and NaCl concentration», *Iranian Journal of Veterinary Science and Technology*, 4(1), pp. 9-18.
- Zeraik, A. E. y Nitschke, M.** (2012) «Influence of growth media and temperature on bacterial adhesion to polystyrene surfaces», *Brazilian Archives of Biology and Technology*. Tecpar, 55(4), pp. 569-576. doi: 10.1590/S1516-89132012000400012.
- Zilbauer, M., Dorrell, N., Wren, B. W. y Bajaj-Elliott, M.** (2008) «*Campylobacter jejuni*-mediated disease pathogenesis: an update», *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, pp. 123-129. doi: 10.1016/j.trstmh.2007.09.019.

11. ANEXO

11. ANEXO.

11.1. Composición de los medios SP4 líquido y sólido.

1ª Fase	
Bacto PPLO Broth (Difco)	4.2 g
Bacto Peptona (Difco)	6.4 g
Bacto Triptona (Difco)	12 g
Agua bidestilada	535 mL
Ajustar pH a 7.8	
Esterilizar a 121°C, 20 minutos	

2ª Fase	
RPMI 1640	60 mL
Extracto fresco levadura (25%pv)	42 mL
Yeastolate (5g/250mL)(Difco)	120 mL
Solución de glucosa (50%)	6 mL
Penicilina G-sódica (100000UI/mL)	6 mL
Rojo fenol (solución 0.1%)	24 mL
Agua bidestilada	200 mL
Ajustar pH a 7.2	
Filtrar por membrana de 0.22µm	

3ª Fase	
Suero equino inactivado	251 mL
Esterilizado por filtración (0.22µm)	

Para elaborar el medio líquido, asépticamente se agregaron a la fase A, las fases B y C, distribuyéndose en tubos de 2 mL. estériles, que se conservaron a -20° C. Para elaborar el medio sólido, antes de mezclar las 3 fases, estas se atemperaron a 45° C, agregando posteriormente a la fase A 8 gramos de agar. Posteriormente, se distribuyeron inmediatamente después en placas de Petri estériles de 15 mm de diámetro, las cuales se conservaron a 4° C.

11.2. Medio para la prueba de la fermentación de la glucosa.

Medio para la fermentación de la glucosa	
Solución de HIB (2,5% p/v)	146 mL
Solución de ADN (0,2% p/v)	2 mL
Suero de caballo inactivado	20 mL
Solución extracto de levadura (10% p/v)	10 mL
Solución de glucosa (10% p/v)	20 mL
Solución de rojo fenol (0,5% p/v)	2 mL
Se ajustó a un pH final de 7,6	

11.3. Medio para la prueba de la hidrólisis de la urea.

Medio para la hidrolisis de la urea	
Solución de HIB (2,5% p/v)	146 mL
Solución de ADN (0,2% p/v)	2 mL
Suero de caballo inactivado	20 mL
Solución extracto de levadura (10% p/v)	10 mL
Solución de urea (10% p/v)	20 mL
Solución de rojo fenol (0,5% p/v)	2 mL
Se ajustó a un pH final de 7,0	

11.4. Medio para la prueba de la hidrólisis de la arginina.

Medio para la hidrolisis de la arginina	
Solución de HIB (2,5% p/v)	146 mL
Solución de ADN (0,2% p/v)	2 mL
Suero de caballo inactivado	20 mL
Solución extracto de levadura (10% p/v)	10 mL
Solución de arginina (10% p/v)	20 mL
Solución de rojo fenol (0,5% p/v)	2 mL
Se ajustó a un pH final de 7,0	

11.5. Medio para la prueba de reducción del tetrazolium.

Medio para la reducción del tetrazolium	
Solución de HIB (2,5% p/v)	146 mL
Solución de ADN (0,2% p/v)	2 mL
Suero de caballo inactivado	40 mL
Solución extracto de levadura (10% p/v)	10 mL
Solución 2,3,5-trifeniltetrazolium (2% p/v)	20 mL

11.6. Soluciones y tampones de extracción de ADN.

Solución denaturante 50 mL	
10 g NaOH (0.5M)	
43.83 g CNa (1.5M)	
Agua destilada	
Tampón de lavado	
120 g tiocianato de guanidina	
100 mL Tris-HCl (pH 6.4)	
Tampón de lisis	
120 g tiocianato de guanidina	
100 mL Tris-HCl (0.1M) (pH 6.4)	
22 mL EDTA (0.2 M) pH 8	
2.6 g Tritón X-100	

11.7. Mezcla PCR (25µl).

Mezcla PCR (25µl)	
Cebadores P1 y P2 (1.0 µM/µl)	1µl/cu/eppendorf
Nucleótidos (dNTPs 1.25 mM cu)	0.5µl/eppendorf
MgCl ₂ (25 mM)	2 µl /eppendorf
Tampón	2.5 µl/eppendorf
Agua de grado molecular (Eppendorf)	9.5 µl/eppendorf
Taq polimerasa (5U/ µl)	0.5 µl/eppendorf

11.8. Proceso de amplificación. Termociclador.

Pasos de la PCR		Condiciones
Desnaturalización inicial del ADN		94°C durante 5 minutos
35 ciclos	Desnaturalización ADN	94°C durante 1 minuto
	Alineación de cebadores	64°C durante 1 minuto
	Amplificación de ADN	72°C durante 1 minuto
Amplificación final de ADN		72°C durante 5 minutos

11.9. Secuencias de 6 cepas de micoplasma pertenecientes a cada uno de los cuatro perfiles bioquímicos.

Perfil	% similitud	especie	cepa
G- T+ U- A-	98	<i>M. aquilae</i>	12C
			61T
	96	<i>M. aquilae</i>	3T
G+ T+ U- A-	98	<i>M. aquilae</i>	25T
G- T+ U- A+	96	<i>M. neophronis</i>	53C
			65C
G- T+ U+ A-	99	<i>M. vericundum</i>	60T
	99	<i>M. nov sp.</i>	

Secuencias en formato FASTA.

>Cfe2667(12C-16S1)

```
TACCTTCTAGATTGGGATAACGCTGAGAAATTAGCGCTAATACCGGATACTTATA
AGAAACGCATGTTTTTATATAAAAGGAGCCTCTAAAGCTCCACTAGAAGATCGG
GGTGCGGAACATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCTATGATGTT
TAACGGGGTTGAGAGACTGATCCGTCACACTGGGACTGAGATACGGCCCAGAC
TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGG
AGCGACACAGCGTGCAAGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTGCTGTTATTTAG
GATGAAAAAATAATAGAGGAAATGCTATTATCTTGACAGTACTAAATCAGAAAGC
AACGGCTtaAACTATGTGCCAGCAGCCGCcgGGTAATACATAGGTTtgGCAAGCGT
TATCCGGAAaTTATTGGGgCGTAAaGCGTCTGTAGGTTtgGTTAGTTAAGTCTGG
CGTCAAAAaCTTGGGGCTCAACCCCcAAATCGCGTTGGATACTGGCTAACTAGA
ATTGTGTAGAGGTTAACGGAATTCCTTGTGAAGCGGgTGAAATGCGTAGATATAA
GGAAGAACATCAACTTGGCGAAGGCaGTTAACTGGGCACATATTGACTGAGA
```

GACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGtCCACGCCGTAA
ACGATGATGATTAGCTGATGGGAACCaTCGGCGCAGCTAACGCATTAATCaTC
CGCCTGAgTAGTATGCTCGCAAGAgTGAAACTTAAAGGAATTGACGGGGATCCG
CACAAGCgGtGGAgCATGTGGTTTtaAtTTgaagGATaCGCGTAAAAACCTTtaCCCAC
TCtTGacaTCTTCTGCAAAAActCTagAGATATAGTGGAGGTTAACAGAATGACAGAT
GGTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTTCGGTTAAGTCCTGCAAC
GAGCGCAACCCTTATCCTTAGTTAAATATCCTAAGGAGACTGCCCGGGTAACTG
GGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCTCTTACGAGTGGGGCAAC
ACACGTGCTACAATGGAAGGTACAAAGAGAAGCAATATGGCGACATGGAGCAAA
TCTCAAAAACCTTTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGT
CGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGCTACGCTACGGTGAATACGTTCTCGGGT
CTTGTACACACCCGCCGTACACCCATGGGAGCTGGTAATGCCCGAAGTCGGTT
TAGTCAACTACGGAGACAACCTGC

>Cfe2669(3T-16S1)

TACCTTCTAGATTGGGATAACGCTGAGAAATTAGCGCTAATACCGGATACTTATA
AGAAACGCATGTTTTTATATAAAAGGAGCCTCTAAAGCTCCACTAGAAGATCGG
GGTGCgGAACATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCTATGATGTT
TAACGGGGTTGAGAGACTGATCCGTCACACTGGGACTGAGATACGGCCCAGAC
TCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTCCACAATGGGCGAAAGCCTGATGG
AGCGACACAGCGTGCAGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAACTGCTGTTATTTAG
GATGAAAAATAATAGAGGAAATGCTATTATCTTGACAGTACTAAATCAGAAAGC
AACGGCTTAAACTATGTGCCAGCAGCCGCCGGTAATACATAGGTTTGGCAAGC
GTTATCCGGAATTATTGGGGCGTAAAAGCGTCTGTAGGTTTGGTTAGTTAAGT
CTGGCGTCAAAAACCTTGGGGCTCAACCCCAATCGCGTTGGATACTGGCTAAC
TAGAATTGTGTAGAGGTTAACGGAATTCCTTGTGAAGCGGGTGAAATGCGTAGA
TATAAGGAAGAACATCAACTTGGCGAAGGCAGTTAACTGGGCACATATTGACAC
TGAGAGACGAAAGCGTGGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCAC
GCCGTAAAACGATGATGATTAGCTGATGGGAACCaTCGGcCGCAGCTAACGCAT
TAAATCCATCCCGCCCTGAgTAGtATGCTCGCCAAGAGTGAAACTTAAAAGGGAA
TTTGAACGGGGATCC

>Cfe2697(25T-16S1)

GcGCTAATACCGGATACTTATaAGAAACGCATGTTTTTATATAAAAGGAGCCTCt
AAAGCTCCACTAGAAGATCGGGGTGCGGAACATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATG
GCTTACCAAGGCTATGATGTTTAAACGGGGTTGAGAGACTGATCCGTCaCACTGG
GACTGAGATACGGCCCAgACTCCTACGGGAGGCAGCAgTAGGGAATTTCCACA
ATGGGcGAAAGCCTGATGGAGCGACACAGCGTGCAGGATGAAGGCCTTCGGGT
TGTAAACTGCTGTTATTTAGGATGAAAAATAATAGAGGAAATGCTATTATCTTGA
CAGTACTaAATCAgAAAgcaaCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCCGGTAATACA

TAGGTTGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAaGCGtctGTAGGTTGTTAGT
 TAAGTCTGGCGTCAAACCTTGGGGCTCAACCCCAAATCGCGTTGGAtAcTGGCTa
 aCTAGAATTGTGtAgAGGTTAACGGAATTCCTTGTGAAGCGGTGaaagGcgtagatata
 AGGAAGAACaTCAaCTTGgcGAAGGCaGtTAACTGGgcACATATTGACACTGAgAG
 ACGAAAGCGtGGGgAaCaAACaggattagATACCCTGGTAgtCCaCGCCGTAAAACGA
 TGATGATTagctGAtGGGAAACCaTCGGGcGCAGCTAACgCATTTAAAATCATCCGC
 CtGAAttAttatGcTCgcAAgAAttGAAAACCTTTAAAGGAATTtGACGGGgaacCcgCA

>Cfe2677(53C-16S1)

TCTACCTTTTAGATTGGAATACCAAATGGAAACATTTGCTAATGCCGGATACGCA
 TGGAACCGCATGGTTCCGTTGTGAAAGGAGCTGnAAGGCTCCGCTAAAAGATGA
 GGGTGCGGAACATTAGTTAGTTGGTAGGGTAATGGCCTACCAAGACTATGATGT
 TTAGCCGGGTTCGAGAGACTGAACGGCCACATTGGGACTGAGATACGGCCCAA
 CTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATATTCCACAATGAGCGAAAGCTTGATG
 GAGCGACACAGCGTGCACGATGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGTGCTGTTATAAG
 GGAAGAACACTACATTGAGGAAATGCTTTGTAGCTGACGGTtACCTTGtCAGAAA
 agGCGATGGCcTAACTATGTtGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGTTCGCAAGC
 GTTATCCGGAAatTTATTGGGCGTAAAGCGTTCGTAGGCTGTTTATTAAaGTCTG
 GAGTCAAATCCCcGGGGCTCAACCCCGGCTCGCTTTGGATACTGGTAAACTAGA
 GTTAGATAGAGGTAAGCGGAATTCCATGTGAAGCGGTGAAATGCGTAGATATAT
 GGAAGAACACCAAAGGCGAAGGCAGCTTACTGGGTCTATACTGACGCTGAGGG
 ACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCTGTAA
 ACGATGATCATTAGTCGGTGGAGAGTTCACTGACGCAGCTAACGCATTAATGA
 TCCGCCTGAGTAGTATGCTCGCAAAGAGTGAAACCTTAAAGGAATTGACGGGGA
 CCCGCACAAGCGGTGGAGCATGGTGGTTTAATTTGAAGATACACGGaAAAACC
 cTtACCCacTCctTGACATCTTcCCGCAAAGcCTATTATAGAGATATAGTGGAGGTTA
 ACGGAAatTGACAGATGGggTGCATGGTTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTT
 TGGTCAAGTCCTGCAACGAGCGCAACCCCTATCTTTAGTTACTAACGAGTCATG
 TCGAGGACTCTAGAGATACTGCCTGGGTAActGGGAGGAAGGTGGGGATGACG
 TCAAATCATCATGCCTCTTACGAGTGGGGCAACACACGCTGCTACAATGGTCGGT
 ACAAAGAGAAGCAATATGGTGACATGGAGCAAATCTCAAAAAGCCGATCTCAGT
 TCGGATTGGAGTCTGCAATTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCA
 GATCAGCTATGCTGCGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCA
 CACCATGGGAGCTGGTAATACCCAAAGTCGGTTTGCTAACCTCGGAGGCGACC
 GCCTAAGGTAGG

>Cfe2680a(60T-16S2)

ACTTCGGGCATTACCAGCTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCG
 AGAACGTATTCACCGTAGCGTAGCTGATCTACGATTACTANCGATTCCGACTTCA
 TGTAGTCGAGTTGCAGACTACAATCCGAActGAGAAAGGTTTTTTGAGATTTGCT

CCATGTCGCCATATTGCTTCTCTTTGTACCTTCCATTGTAGCACGTGTGTTGCC
CACTCGTaAgAGGCATGATGATTTGACGTGTCACCCACCTTCCCTCCAGTTACCC
GGGCAGTCTCCTTAGGATATTTAacTAAGGATAAAGGTTGCGCTCGTTGCAGGA
CTTAAcCGAACaTCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCATCTGTCAATT
CTGTTAACCTccacTATATCTCTATAGCTTTGCAGAAGATGTCAAGAGTGGGTaAG
GtTCTACGCGTATCTTCAAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGATCCCC
GTCAATTCCTTTAAGTTTCACTCTTGCAGCATACTACTCAGGCgGATGATTTAN
TGCGTTAGCTGCGCCGATGA

>Cfe2671(61T-16S1)

TGGGTGAGTAACACGTAACGTACCTTCTAGATTGGGATAACGCTGAGAAA
TTAGCGCTAATACCGGATACTTATAAGAAACGCATGTTTTTTATATAAAAGGAGC
CTCTAAAGCTCCACTAGAAGATCGGGGTGCGGAACATTAGCTAGTTGGTAAGGT
AATGGCTTACCAAGGCTATGATGTTAAACGGGGTTGAGAGACTGATCCGTCACA
CTGGGACTGAGATACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTT
CCACAATGGGCGAAAGCCTGATGGAGCGACACAGCGTGCAGGATGAAGGCCTT
CGGGTTGTAACCTGCTGTTATTTAGGATGAAAAATAATAGAGGAAATGCTATTA
TCTTGACAGTACTAAATCAGAAAGCAACGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGG
TAATACATAGGTTGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGTCTGTAG
GTTGTTAGTTAAGTCTGGCGTCAAACTTGGGGCTCAACCCCAAATCGCGTTGG
ATACTGGCTAACTAGAATTGTGTAGAGGTTAACGGAATTCCTTGTGAAGCGGTG
AAATGCGTAGATATAAGGAAGAACATCAACTTGGCGAAGGCAGTTAACTGGGCA
CATATTGACACTGAGAGACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCCT
GGTAGTCCACGCCGTAACGATGATGATTAGCTGATGGGAACCATCGGCCGA
GCTAAACGCATTAATCATCCGCCTGAGTAGTATGCTCGCAAGAGTGAACCTTAA
AGGAATTGACGGGgATCCGCACAAGCGGtGGAGCATGTGGTTTTATTTGAAgAT
aCGCGTTAAACCTTaCCCCCTCTTGAcTCCTTCTGCAAAGCTTTTAgAGAtNATA
GtGGAgGTTAACAGAAAatGACAGAtGGGGGGCATGGTTGtCCgTCAGCTCGTGTC
GTGAGATGTTTCGGTTAAGTCCTGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTAGTTAATA
TCCTAAGGAGACTGCCCGGGTAACTGGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATC
ATCATGCCTCTTACGAGTGGGGCAACACACGTGCTACAATGGAAGGTACAAAGA
GAAGCAATATGGCGACATGGAGCAAATCTCAAAAACCTTTCTCAGTTTCGGATT
GTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTAGATCAGC
TACGCTACGGTGAATACGTTCTCGGGTCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATG
GGAGCTGGTAATGCCCGAAGTCGGTTTAGTCAACTACGGAGACA

>Cfe2699(65C-16S1)

tTTTAGATTGGAATACCCAATGGAAACATTGGTTAATGCCGGATACGCATGGAAT
CGCATGATTCCGTTGTGAAAGGGGCGTTTGCCCCACTAAAAGATGAGGGTGC
GAACATTAGTTAGTTGGTGgGGTAATGGCTCACCAAGACTATGATGTTTAGCCG

GGTCGAGAGACTGAACGGCCACATTGGGACTGAGATACGGCCAAACTCCTAC
GGGAGGCAGCAGTAGGGAATATTCCACAATGAGCGAAAGCTTGATGGAGCGAC
ACAGCGTGACGATGACGGTCTTCGGATTGTAAAGTGCTGTTATAAGGGAAGAA
CACTAAGATGAGGAAATGCTTCTTAGCTGACGGTACCTTGTCAGAAAGCGATGG
CTAACTATGTGCCAgCAGCCGCGGTAATACATAGGTCGCAAGCGTTATCCGGAA
TTATTGGgcGtAAAGCGTTCGTAGGCTGTTTATTAAGtctGGAGTCaAATCCCAGGG
CTCAACCCTGGCTCGCTTTGGATACTGGTAAACTAGAGTTGGATAgAGGTAAGC
GGAATTCCaTGtGAAGCGGTGAAATGCGTAgATATATGGAAGAACACCAAAGGCG
AAGGCagcttaCTGggtCTTAACTGACGCTGAGGGACGAAAGCGTGGGGGagcAAAC
AGGATTAGATACCCCTGGTAGtCCACGCCGTAAACGATGATCaTTAgTCGGGAAA
GATGTTACTGACgCacCTAACgCATTAAATTGAATCCgcCCTGAAGTAAttatGccTCg