

PROGRAMA DE RECERCA I CONSERVACIÓ DEL ZOO DE BARCELONA, 2017

INFORME FINAL

1. **Títol:** Residus de medicaments en aus carronyaires als Pirineus amb especial èmfasi en el trençalòs (*Gypaetus barbatus*).
2. **Investigador principal:** Ignasi Marco.
3. **Organització:** Universitat Autònoma de Barcelona.
4. **Data:** 28 de Febrer de 2019.
5. **Activitats realitzades i resultats:**

Objectiu 1. Determinació de la presència de residus de medicaments en el voltor comú.

S'han obtingut mostres d'òrgans de 90 voltors comuns (*Gyps fulvus*) de l'àmbit dels Pirineus. Hem obtingut resultats positius per la presència de residus de medicaments en 5 animals: dos voltors amb residus de meloxicam, dos amb residus de flunixin i un amb residus de nimesulida (Taula 1).

Els resultats han estat negatius per la detecció de la resta de fàrmacs: àcid tolfenàmic, suxibuzona, fenilbutazona, carprofen, diclofenac, indometacina, ketoprofen i naproxen. També han estat negatius per la detecció de residus d'antibiòtics. No obstant això, aquest resultats contrasten amb els obtinguts anteriorment en un estudi realitzat pel nostre grup de recerca en el qual es va trobar una elevada presència de residus d'antibiòtics en mostres de sang obtingudes a partir de voltors vius a Catalunya (Casas-Díaz et al. 2016. Determination of fluoroquinolone antibiotic residues in the plasma of Eurasian griffon vultures (*Gyps fulvus*) in Spain. Science of the Total Environment 557-558:620-626). Es per això que tenim previst repetir les anàlisis per confirmar aquest resultats.

Taula 1. Voltors comuns positius a la presència de residus de medicaments.

Referència	Lloc	Teixit analitzat	Data anàlisi	Flunixin (mg/Kg)	Meloxicam (mg/Kg)	Nimesulida (mg/Kg)
T094/10	Aragó	Fetge	13/06/2018	0,33	0	0
GF-17011	Catalunya	Ronyó	13/06/2018	0	0,653	0
		Fetge	13/06/2018	0	0,408	0
VL 17/2313	Catalunya	Ronyó	26/06/2018	0	0,175	0
		Fetge	26/06/2018	0	0,218	0
VL 17/2150	Catalunya	Ronyó	26/06/2018	0	0	1,22
T072/18	Catalunya	Ronyó	11/07/2018	22,111	0	0
		Fetge	11/07/2018	4,935	0	0

Objectiu 2. Determinació de residus de medicaments en els trencalossos captius del pla de cria en captivitat a Catalunya i avaluació del seu estat sanitari mitjançant la realització d'un hemograma i bioquímica sanguínia.

Obtenció de les mostres sanguínies

Durant els mesos de maig i juny de 2018, vam obtenir mostres sanguínies de 14 trencalossos en dues visites realitzades al Centre de Recuperació de fauna salvatge de Vallcalent (Lleida) i de 2 trencalossos en una visita realitzada al Centre de Recuperació de Torreferrussa (Santa Perpètua de Mogoda).

Amb la col·laboració del personal dels centres vàrem procedit a la captura i pesatge de cada animal. Mentre un investigador obtenia les mostres de sang, l'altra s'encarregava d'etiquetar-les i emmagatzemar-les correctament. Es va extreure 10 ml. de sang de la vena braquial de cada trencalòs, amb una agulla 23G i una xeringa de 10 ml. Immediatament a l'extracció, es van realitzar 2 frotis de sang, omplir un tub d'1 ml d'EDTA, un tub de 4 ml d'heparina de liti i la resta s'emmagatzemava en un tub sense anticoagulant. El temps de manipulació per cada animal va ser de 10-15 minuts. Es van obtenir dades bàsiques de la història mèdica de cada un dels animals, així com de la seva dieta.

Cal destacar que per un error, durant la segona visita al Centre de Vallcalent, a Lleida, vàrem mostrejar dues vegades el mateix animal (referència GB18001 i GB18016). És per això que hem eliminat de l'estudi la segona presa de mostres (GB18016).

Resultats

A l'arribada al laboratori es va procedir a la realització de l'hemograma (Taula 2). A més es va procedir a la centrifugació i conservació en congelació de les mostres de sang, plasma i sèrum fins a la seva anàlisi.

Taula 2. Hemograma dels 16 trencaossos.

Ref.	Sexe	Edat (anys)	Hematocrit (%)	Hemoglobina (g/dL)	Eritròcits ($\times 10^{12}/L$)	Leucòcits ($\times 10^9/L$)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/L)
GB18001	M	1	37	12,20	3,31	14,52	111,78	36,86	32,97
GB18002	M	17	36	12,70	2,16	5,72	166,67	58,80	35,28
GB18003	F	30	37	12,40	2,22	5,50	166,67	55,86	33,51
GB18004	M	20	38	12,40	2,84	11,22	133,80	43,66	32,63
GB18005	F	29	34	11,50	2,16	11,11	157,41	53,24	33,82
GB18006	M	10	36	12,00	1,94	5,61	185,57	61,86	33,33
GB18007	F	9	40	13,30	1,93	5,61	207,25	68,91	33,25
GB18008	F	9	35	12,20	2,31	7,04	151,52	52,81	34,86
GB18009	M	9	38	12,80	1,80	9,68	211,11	71,11	33,68
GB18010	M	13	40	13,10	2,59	9,35	154,44	50,58	32,75
GB18011	F	12	37	11,80	1,89	8,91	195,77	62,43	31,89
GB18012	M	18	37	11,90	1,54	4,84	240,26	77,27	32,16
GB18013	M	0,5	31	9,70	1,51	3,96	205,30	64,24	31,29
GB18014	M	6	38	13,00	3,42	12,76	111,11	38,01	34,21
GB18015	F	7	33	11,20	3,6	11,77	91,67	31,11	33,94
GB18017	M	NA	28	8,10	3,21	8,69	87,23	25,23	28,93

Taula 2 (continuació).

Ref.	Sexe	Edat (anys)	Limfòcits (x10 ⁹ /L)	Monòcits (x10 ⁹ /L)	Heteròfils (x10 ⁹ /L)	Eosinòfils (x10 ⁹ /L)	Basòfils (x10 ⁹ /L)	Proteïnes totals (g/dL)
GB18001	M	1	3,9204	1,0164	7,6956	1,452	0,117612	5,20
GB18002	M	17	1,6588	0,286	3,146	0,572	0,0572	4,40
GB18003	F	30	1,265	0,44	2,805	0,825	0,165	4,80
GB18004	M	20	2,244	0,4488	6,732	1,3464	0,4488	4,60
GB18005	F	29	2,8886	0,2222	6,8882	0,7777	0,3333	4,70
GB18006	M	10	1,7391	0,2805	2,9172	0,6732	0	4,80
GB18007	F	9	1,9635	0,4488	2,9172	0,2244	0,0561	4,90
GB18008	F	9	1,9008	0,1408	4,5056	0,4928	0	4,80
GB18009	M	9	1,936	0,1936	6,6792	0,3872	0,484	6,90
GB18010	M	13	3,179	0,2805	4,3945	1,4025	0,0935	5,60
GB18011	F	12	1,6929	0,5346	5,5242	0,9801	0,1782	5,00
GB18012	M	18	1,5972	0,0484	2,904	0,242	0,0484	4,60
GB18013	M	0,5	1,3464	0,198	1,782	0,5544	0,0792	4,50
GB18014	M	6	4,0832	0,3828	6,5076	1,4036	0,3828	4,80
GB18015	F	7	3,1779	0,5885	6,1204	1,5301	0,3531	4,80
GB18017	M	NA	2,5201	0,3476	4,2581	1,2166	0,3476	5,00

Amb posterioritat s'ha realitzat l'anàlisi de bioquímica sanguínia (Taula 3).

Taula 3. Bioquímica sanguínia dels 16 trencalossos.

Referència	Sexe	Edat (anys)	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALP (U/L)	Àcids biliars (µmol/L)	CK (U/L)	Calci (mg/dL)	Clor (mmol/L)	Colesterol (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
GB18001	M	1	8,6	118,1	141,4	46,9	2390,2	10,14	118,8	298,9	0,27
GB18002	M	17	12,6	148,1	174,1	12,8	1414,6	10,07	118	208,9	0,27
GB18003	F	30	6,1	126,7	106,4	9,8	1106,1	9,85	118,8	244,8	0,27
GB18004	M	20	8,8	144,8	56,3	4,2	1672,2	10,05	118,9	263,8	0,26
GB18005	F	29	7,6	136,1	56,3	5,4	1260,8	9,81	121	243	0,24
GB18006	M	10	14,8	106	320,1	10,8	1358,2	9,82	124,1	303,3	0,25
GB18007	F	9	9,8	149,2	107,8	5,3	1040,7	10,2	119,9	274,6	0,26
GB18008	F	9	7,1	130,5	138,8	4,4	1059,8	9,67	122,5	272,5	0,29
GB18009	M	9	6,7	140,3	278,5	10,4	1664,1	9,83	119,6	603,2	0,3
GB18010	M	13	9,9	169,9	171,2	9	1570,3	9,78	122,8	300,8	0,32
GB18011	F	12	8,6	120,9	68,4	2,8	787,6	10,01	122,3	271,3	0,27
GB18012	M	18	12,2	112,8	54,7	2,4	1155,9	9,14	120,4	223,7	0,26
GB18013	M	0,5	6,8	124,4	289,2	11	2476,7	10,4	119	280,9	0,29
GB18014	M	6	6	82,5	76,2	5,1	931,2	9,89	120,8	276,8	0,25
GB18015	F	7	4	94,5	211	23,4	730,2	9,92	121	220	0,27
GB18017	M	NA	10,1	262	33,4	2,3	3388,7	8,25	122,9	156,8	0,21

Taula 3 (continuació).

Referència	Sexe	Edat (anys)	Glucosa (mg/dL)	GLDH (U/L)	LDH (U/L)	Potassi (mmol/L)	Ratio (P+A)/G*	Sodi (mmol/L)	Triglicèrids (mg/dL)	Àcid úric (mg/dL)
GB18001	M	1	237,3	3,1	2377,5	4,01	1,87	155,3	83,1	5,11
GB18002	M	17	276,6	5,7	1402,1	3,82	1,4	155,9	86,9	7,57
GB18003	F	30	302,9	3,6	1453,3	3,9	1,39	153	74,9	6,67
GB18004	M	20	274,4	3,7	1649,1	3,15	1,66	149,8	61,1	2,8
GB18005	F	29	270,5	2,9	2029,2	3,47	1,18	150,6	63,7	3,17
GB18006	M	10	277,2	2,3	1716,1	4,14	1,81	153,9	74,5	5,63
GB18007	F	9	334,3	3,9	1493,1	3,61	1,17	155,3	78,5	8,44
GB18008	F	9	329,9	2,7	2187,9	3,62	1,34	155,3	83,6	5,49
GB18009	M	9	238,5	3,5	3824,4	4,37	0,96	150,9	88,6	2,06
GB18010	M	13	297,8	3,6	2220,6	3,75	1,57	154,2	123,3	7,81
GB18011	F	12	300,3	2,4	1350,2	3,82	1,51	151,7	73,4	3,96
GB18012	M	18	260,1	2,1	1723,7	4,2	1,48	150,9	66,5	1,76
GB18013	M	0,5	248,5	1,7	2298,9	4,71	2,01	149,6	122,8	9,7
GB18014	M	6	256,5	2,7	1047,7	4,02	1,41	151,4	78,6	4,19
GB18015	F	7	257	2,6	1091	4,12	1,44	149,7	88,6	7,81
GB18017	M	NA	257,8	5,8	2753,1	6,2	0,49	152,9	39,6	1,41

Tot i que alguns individus mostren valors d'hematòcrit i hemoglobina lleugerament més baixos dels publicats a la bibliografia, són molt similars als obtinguts a la resta de trencaïssos dels dos centres de cria. A més, la resta de valors hematològics d'aquests dos animals entren dins del rang de la normalitat descrits en la bibliografia. Pel que fa als valors de la bioquímica sanguínia també s'inclouen dintre del rang de normalitat.

Dos dels animals del Centre de Recuperació de Vallcalent havien presentat en el passat problemes sanitaris. En concret el trencaïssos amb referència GB18001 havia patit una fractura de tibiotars i el trencaïssos amb referència GB18012 havia patit una infecció per fongs (aspergil·losi). No obstant això, els resultats de l'analítica sanguínia no indiquen cap alteració important, pel que la seva recuperació ha estat total.

Addicionalment, tot i que no estava previst al projecte inicial, es va considerar important l'avaluació de l'estrès en aquests animals mitjançant la determinació de la corticosterona sanguínia i en ploma (Taula 4 i 5).

Taula 4. Valors de corticosterona en sèrum.

Referència	Mostra	Corticosterona (ng/ml)
GB18001	Sèrum	40,66
GB18002	Sèrum	85,39
GB18003	Sèrum	98,60
GB18004	Sèrum	85,39
GB18005	Sèrum	130,48
GB18006	Sèrum	29,03
GB18007	Sèrum	170,71
GB18008	Sèrum	66,77
GB18009	Sèrum	100,87
GB18010	Sèrum	100,49
GB18011	Sèrum	105,56
GB18012	Sèrum	129,99
GB18013	Sèrum	36,85
GB 18014	Sèrum	18,23
GB 18015	Sèrum	52,40
GB 18017	Sèrum	39,45

Taula 5. Valors de corticosterona en ploma.

Referència	Mostra	Longitud (mm)	Corticosterona (pg/mm)	Pes triturat (mg)	Corticosterona (pg/mg)
GB18001	Ploma	258	6,43	168,9	9,82
GB18002	Ploma	201	8,38	131,0	12,85
GB18003	Ploma	199	17,63	142,4	24,64
GB18004	Ploma	235	5,58	116,4	11,27
GB18005	Ploma	225	8,51	190,9	10,03
GB18006	Ploma	262	7,25	204,9	9,28
GB18007	Ploma	224	2,41	165,6	3,25
GB18008	Ploma	197	9,94	137,9	14,21
GB18009	Ploma	197	23,13	183,3	24,86
GB18010	Ploma	195	14,67	126,7	22,58
GB18011	Ploma	225	3,07	182,3	3,79
GB18012	Ploma	200	9,25	128,2	14,44
GB18013	Ploma	194	2,84	127,7	4,32
GB 18014	Ploma	237	6,54	126,3	12,27
GB 18015	Ploma	196	10,19	138,5	14,41
GB 18017	Ploma	221	14,28	179,9	17,54

Les concentracions de glucocorticoides en les espècies de fauna salvatge poden ser un bon indicador de l'estrès fisiològic i la capacitat de respondre a les alteracions del seu entorn i s'han utilitzat àmpliament per determinar la condició general a nivell individual i poblacional. La corticosterona és el principal glucocorticoid alliberat a l'eix hipotàlem-pituitària-adrenal (HPA) en ocells en resposta a les pertorbacions. Aquesta hormona té l'objectiu de restaurar l'homeòstasi i promoure respostes de comportament per superar l'estat d'estrès i tornar a les condicions inicials. No obstant això, sota cronicitat i intensitat dels agents estressants, les elevacions prolongades de les concentracions de corticosterona poden tenir efectes perjudicials per als organismes en una sèrie de trets relacionats amb l'aptitud, com la immunosupressió, reducció del creixement i disminució de la fertilitat i taxes de supervivència. L'avaluació de les concentracions de corticosterona en plomes és un indicador de les concentracions en plasma durant el temps de creixement d'aquesta estructura.

En els trencaossos del nostre estudi hem trobat valors en sang més elevats en alguns individus en comparació amb els fins ara descrits. No obstant això, els valors obtinguts en la mostra de ploma d'aquests individus no mostren una elevació paral·lela, pel que no es tracta d'un estrès crònic sinó d'un estrès puntual degut a l'activitat nostra durant la captura i obtenció de les mostres a l'entorn de les gàbies de reproducció.

Pel que fa a l'avaluació de residus de medicaments en els trencaossos del programa de cria, els resultats han estat els següents:

1. Residus de fàrmacs antiinflamatoris:

Els resultats han estat negatius. Tot i que ens consta que els trencaossos amb número de referència GB18001 i GB18012 van estar tractats amb l'antiinflamatori meloxicam, no l'hem detectat a nivell sanguini degut a que feia més de 6 mesos d'aquests tractaments i ja s'havia eliminat completament.

2. Residus d'antibiòtics:

Hem trobat resultats positius per les anàlisis dels antibiòtics ciprofloxacina i enrofloxacina en 6 dels trencaossos (Taula 6). Cal destacar però, que el trencaòs amb número de referència GB18017 havia estat tractat recentment amb l'antibiòtic enrofloxacina. Es per això que hem trobat valors extremadament elevats.

Taula 6. Residus d'antibiòtics trobats als trenallosos.

Referència	Ciprofloxacina (ng/ml)	Enrofloxacina (ng/ml)
GB18001	0	0
GB18002	0	0
GB18003	0	25,30
GB18004	0	1,23
GB18005	0	0
GB18006	0	0
GB18007	0	3,53
GB18008	0	14,10
GB18009	0	9,63
GB18010	0	0
GB18011	0	0
GB18012	0	0
GB18013	0	0
GB 18014	0	0
GB 18015	0	0
GB 18017	191,93	4466,34

6. Conclusions

Es confirma la presència de residus de medicaments d'ús veterinari en el voltor comú als Pirineus. La major part dels voltors positius han donat valors de residus que no superen els nivells de toxicitat per a voltors del gènere *Gyps*. No obstant això, en un dels voltors analitzats (amb referència T072/18) els nivells de flunixin eren molt elevats i es van associar amb una intoxicació letal ja que presentava lesions de gota visceral. Aquestes dades evidencien que els residus de medicaments arriben a la cadena tròfica dels voltors, el que pot suposar un greu impacte en les poblacions si aquests animals tenen accés a cadàvers d'animals domèstics tractats amb determinats medicaments, com el flunixin.

L'estat sanitari dels trencaossos pertanyents al pla de cria en captivitat a Catalunya és bo. No obstant això, hem trobat residus d'antibiòtics en una proporció elevada d'individus. Malgrat les baixes concentracions d'antibiòtics trobades, que no superen els nivells de toxicitat, és preocupant el fet que animals tan valuosos estiguin exposats a aquests medicaments. La font més probable d'aquests residus són els conills de granja amb els quals s'alimenten. Per tant, caldria revisar la seva alimentació i garantir que no tinguin accés a carnyes tractades amb medicaments veterinaris.

En les aus carronyaires, la ingestió d'antibiòtics a partir de cadàvers d'animals domèstics medicats poden tenir conseqüències molt negatives, ja que poden alterar la microbiota en el tracte digestiu, augmentant així la susceptibilitat a patògens fúngics i bacteris oportunistes. A més, això també pot contribuir a la creació de resistències als antibiòtics i a l'amplificació de les mateixes. Per exemple, ja s'ha descrit al centre d'Espanya soques del bacteri *Salmonella*, aïllades en voltors, que són resistents a dos o més agents antimicrobians.

Es preveu que en un futur l'exposició de les aus carronyaires a medicaments presents en els cadàvers d'animals domèstics augmenti, com a conseqüència del creixement del bestiar produït en règim intensiu, el qual requereix de nombrosos tractaments veterinaris. Aquest aspecte és especialment rellevant i important als punts d'alimentació suplementària (PAS) per aus carronyaires, que han estat i són una eina clau per a la conservació d'aquestes espècies. Per tant, s'hauria de controlar escrupolosament que l'aliment que es proporciona a les aus carronyaires no es portador de residus de medicaments.

7. Justificació econòmica

Despeses d'activitats	
- Anàlisis toxicològiques	3.152,18 €
- Anàlisis sanguínies (hemograma i bioquímica) i histopatològiques	1.592,25 €
- Enviament de mostres sanguínies al “Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos”, Ciudad Real)	306,11 €
- Viatges i dietes Dos viatges al Centre de Recuperació de Vallcalent a Lleida, i un viatge al Centre de Recuperació de Torreferrussa a Sta, Perpetua de Mogoda	251,8 €
- Material de laboratori fungible per l'extracció i anàlisi de les mostres sanguínies	508,45 €
Sou parcial d'un tècnic de suport a la recerca	4.000 €
TOTAL	10.000,8 €

Annexa.

Figura 1. Estudiants a la sala de necròpsies de la Facultat de Veterinària prenent mostres de voltor comú.



Figura 2. Instal·lacions de cria i captura d'un dels trencalossos.



Figura 3. Obtenció de mostres de sang als trencalossos del centre de cria de Vallcalent, a Lleida.



Figura 4. Trençalòs al centre de cria de Vallcalent, Lleida.

