

PROGRAMA DE RECERCA I CONSERVACIÓ DEL ZOO DE BARCELONA, 2018

INFORME FINAL

1. **Títol:** Estudi de la presència de diclofenac i d'altres fàrmacs antiinflamatoris en mostres sanguínies de voltor comú (*Gyps fulvus*).
2. **Investigador principal:** Ignasi Marco.
3. **Organització:** Universitat Autònoma de Barcelona.
4. **Data:** 16 d'abril de 2020.

5. Activitats realitzades i resultats:

Objectiu 1. Determinació de la presència de diclofenac i d'altres fàrmacs a la sang en voltor comú.

Per avaluar el risc d'exposició a diclofenac i a altres fàrmacs antiinflamatoris no esteroïdals (AINEs) al voltor comú (*Gyps fulvus*), hem obtingut mostres sanguínies de 136 individus capturats pel Grup d'Anellament Calldetenes-Osona (GACO) a l'abocador d'Orís (Osona). Tot i que la previsió inicial que es va plantejar a la proposta era la realització d'un mostreig entre 70 i 100 individus, hem pogut incrementar el nombre fins als 136 esmentats, sense cap despesa addicional.

Es va extreure 10 ml. de sang de la vena braquial amb una agulla 23G i una xeringa de 10 ml. Immediatament a l'extracció, es van realitzar omplir un tub d'1 ml d'EDTA i un tub amb heparina de liti per les analítiques de residus de fàrmacs. El temps de manipulació per cada animal va ser de 10 minuts.

Anàlisi dels AINEs. Els compostos seleccionats per l'anàlisi (carprofè, diclofenac, flunixina, indometacina, cetoprofen, meloxicam i naproxè) van ser els inicialment coberts pel mètode desenvolupat per Taggart et al., 2009 (Taggart, M. A.; Senacha, K. R.; Green, R. E.; Cuthbert, R.; Jhala, Y. V.; Meharg, A. A.; Mateo, R.; Pain, D. J. Analysis of Nine NSAIDs in Ungulate Tissues Available to Critically Endangered Vultures in India. Environ. Sci. Technol. 2009, 43 (12), 4561-4566; DOI 10.1021/es9002026.). A més, hem incorporat altres AINEs utilitzats en medicina veterinària a Espanya: àcid tolfenàmic, suxibuzona i fenilbutazona. Els estàndards analítics dels 10 AINEs analitzats es van obtenir de Sigma-Aldrich: carprofè (33975), sal disodi de diclofenac (D6899), flunixina meglumina (F0429), indometacina (I8280), cetoprofen (34016), sodi hidratat de meloxicam sal (M3935), naproxè (N8280), àcid tolfenàmic (T0535), suxibuzona (S2400000) i fenilbutazona (P8386). Flunixin-d3 (34083) es va utilitzar com a estàndard intern. El mètode d'extracció utilitzat per als teixits també es basa en el descrit per Taggart et al., 2009.

En l'estudi sobre residus d'AINEs en voltors morts i en les carronyes que es fan servir per la seva alimentació a Espanya i Portugal que estem portant a terme des de fa 3 anys, finançat per la Morris Animal Foundation (Estats Units), hem obtingut resultats preliminars molt importants. Hem detectat un risc potencial d'exposició a diclofenac i altres AINEs mitjançant la detecció d'aquests residus en les carronyes amb que s'alimenten els voltors (en el 3% de les 228 carronyes analitzades a

Espanya). En concret hem trobat residus de diclofenac en un porc, tot i que a nivells baixos. També en les analítiques fetes a voltors morts, amb 11 dels 306 òrgans dels voltors comuns analitzats amb residus d'AINEs en fetge i/o ronyó, el que correspon a un 3,5%. Tot i que no hem trobat residus de diclofenac als voltors, sí que hem trobat nivells de flunixinina en 3 voltors compatibles amb la intoxicació aguda. Per tant hem pogut confirmar l'existència d'un elevat risc ja que els AINEs estan arribant als voltors a través de la seva dieta.

En el present estudi, hem complementat l'avaluació del risc d'exposició a diclofenac i altres AINEs en voltors morts a Espanya del projecte abans esmentat, amb l'anàlisi de voltors vius capturats pel seu marcatge. Els resultats han estat negatius per la detecció de AINEs en els 136 voltors mostrejats i analitzats. Existeix una dificultat en la detecció d'aquests residus de fàrmacs en sang degut a que tenen una vida mitja d'eliminació més curta (4 h.) que a múscul (15 h.) i ronyó i fetge (6-8 h.) A més, la taxa d'eliminació total és molt més lenta en tots els teixits, d'unes 25-98 h després de la darrera injecció, que a la sang (Green, E. E.; Taggart, M. A.; Das, D.; Pain, D. J.; Kumar, S. C.; Cunningham, A. A.; Cuthbert, R. Collapse of Asian vulture populations: Risk of mortality from residues of the veterinary drug diclofenac in carcasses of treated cattle. *J. Appl. Ecol.* 2006, 43 (5) 949-956; DOI 10.1111/j.1365-2664.2006.01225.x.). És per això que és més fàcil la seva detecció en òrgans com el fetge o ronyó que a la sang. Però és evident que el primer només es pot fer a partir d'animals morts.

Tota aquesta informació ja ha estat enviada, amb data 3 d'abril de 2020, per la seva publicació a "Environment International", una revista científica d'elevat índex d'impacte (7.943). S'ha inclòs a la Fundació Barcelona Zoo com a entitat finançadora de l'estudi. A l'annex 1 es troba el resum en anglès.

Objectiu 2. Determinar l'estat sanitari dels voltors mitjançant la realització d'un perfil hematològic.

Vam obtenir mostres sanguínies de 58 voltors per aquesta part de l'estudi. Com s'ha comentat en l'apartat anterior, es va obtenir sang en un tub d'1 ml d'EDTA. A l'arribada al laboratori es va procedir a la realització de l'hemograma. Els resultats es poden veure a la Taula 1.

Taula 1. Anàlisis sanguínies de 58 voltors comuns.

Referència (anella)	DATA	EDAT (anys)	Eritròcits (x10 ¹² /L) (Manual)	Eritròcits (x10 ¹² /L) (Automàtic)	Leucòcits (x10 ⁹ /L) (Manual)	Leucòcits (x10 ⁹ /L) (Automàtic)	Hematocrit (%) (Manual)	Hematocrit (%) (Automàtic)	Proteïnes totals (g/dl)
1A9	21/07/2019	>9	0,40		30,14				
1AC	21/07/2019	>7	0,94		23,98				
1AJ	21/07/2019	>7	2,79		38,94				
1AL	21/07/2019	>8	2,45		39,60				
1AP	21/07/2019	>8	0,80		35,86				
1AR	21/07/2019	>8	0,13		31,02				
1AX	21/07/2019	1	1,04		33,44				
1C1	21/07/2019	2	1,35		29,92				
1C2	21/07/2019	3	0,95		23,98				
M7A	21/07/2019	>9	0,25		19,14				
WL8	21/07/2019	>4	2,48		34,32				
PTR	21/07/2019	>6	0,46		20,68				
GHK	21/07/2019	1	2,38		33,44				
WPC	21/07/2019	2	2,67		29,04				
WTP	21/07/2019	4	0,72		25,96				
1FX	12/10/2019	>5	2,30	2,89	31,46	0,83		14,5	
1H5	12/10/2019	2		2,90		0,90		14,1	
1T8	12/10/2019	>8		2,79		0,49		14,2	
1TF	12/10/2019	>4		2,72		0,80		14,4	
1TN	12/10/2019	0 (<1)		2,51		0,51		12,7	
1TP	12/10/2019	>11	2,05	2,72	21,34	0,49		14,2	
1TT	12/10/2019	>3	1,93	2,56	28,82	0,52		14,0	
1TU	12/10/2019	>3		2,69		0,50		14,5	
1TW	12/10/2019	2	1,87	2,86		0,85		15,3	
1U0	12/10/2019	>3	2,16	2,69	24,40	1,23		14,4	
1U2	12/10/2019	4		2,76		0,64		14,1	
RF5	12/10/2019	>7	1,67	2,70	21,75	1,66		13,8	
RL9	12/10/2019	>11	2,08	2,66	28,16	0,30		14,3	
RLW	12/10/2019	>10	1,89	2,68	16,50	0,47		13,9	
TL3	12/10/2019	>4	1,49	2,60	75,46	0,48		13,3	
TR5	12/10/2019	>10		2,91		0,38		14,0	
VO1	12/10/2019	>11		2,71		0,46		13,7	
WWU	12/10/2019	3		2,58		0,44		13,3	
X38	12/10/2019	>9		2,64		0,50		14,3	

Taula 1 (continuació).

Referència	DATA	EDAT (anys)	Eritròcits (x10 ¹² /L) (Manual)	Eritròcits (x10 ¹² /L) (Automàtic)	Leucòcits (x10 ⁹ /L) (Manual)	Leucòcits (x10 ⁹ /L) (Automàtic)	Hematocrit (%) (Manual)	Hematocrit (%) (Automàtic)	Proteïnes totals (g/dl)
X8P	12/10/2019	>9	1,97	2,79	40,92	0,44		13,1	
X8R	12/10/2019	2	1,81	2,73	16,28	0,65		13,7	
X8U	12/10/2019	>7	1,87	2,56	27,06	0,55		13,4	
12N	09/11/2019	2		2,67		0,61	46	13,5	4,3
13U	09/11/2019	>4		2,49		1,12	46	13,2	4,0
13W	09/11/2019	>4		2,71		2,71	48	13,7	3,8
141	09/11/2019	1		2,89		0,54	50	14,5	4,2
14U	09/11/2019	3	2,37	2,78	9,68	0,70	47	13,3	3,9
1U7	09/11/2019	0 (<1)		2,39		0,56	49	12,6	4,1
1VR	09/11/2019	>9	2,22	2,94	28,60	0,66	52	15,1	4,1
1VP	09/11/2019	3		2,47		0,60	46	13,3	4,4
1WA	09/11/2019	>9		2,85			48	14,0	3,9
1WF	09/11/2019	>11		2,79		0,39	49	14,1	3,9
1WM	09/11/2019	0 (<1)		2,47		1,04	43	12,6	3,8
1WN	09/11/2019	2		2,68		0,48	47	13,9	4,2
7LR	09/11/2019	>9		2,59		1,04	46	12,9	4,2
NLM	09/11/2019	7		2,42		0,47	43	12,5	4,1
PLH	09/11/2019	>11	1,32	2,30	14,08	0,74	39	11,8	4,4
11R	09/11/2019	>4		2,37		0,56		12,0	
WPN	09/11/2019	>7	2,17	2,91	16,06	1,34	49	14,2	4,5
WTU	09/11/2019	5	0,89	2,54	11,80	0,61	49	13,9	3,7
WUH	09/11/2019	2		2,56		0,88	46	13,1	4,0
WUL	09/11/2019	>5		2,66		0,36	48	13,6	4,2
X1P	09/11/2019	5	1,37	2,29		0,54	40	11,7	3,5
Mitjana			1,61	2,66	27,80	0,72	47	13,6	4,1
SD			0,74	0,17	12,02	0,43	3,24	0,81	0,25

Per a les anàlisis hematològiques, tot i que inicialment no estava previst, hem realitzat una comparació entre el mètode manual estàndard (de referència) i el mètode automàtic amb un analitzador Sysmex que disposem en fase de proves al Servei d'Hematologia Clínica de la Facultat de Veterinària, del qual formem part. Com es pot veure a la taula, el recompte manual no s'ha pogut realitzar en tots els animals degut a que és una tècnica laboriosa, que pot comportar al voltant de 45 minuts la realització de l'hemograma d'un ocell. A més, aquestes anàlisis s'han de fer amb la mostra fresca i es recomanable que no passin més de 24 hores des de l'obtenció de la mostra per fer l'anàlisi. Igualment no es va poder realitzar el recompte automàtic amb els primers animals perquè encara no disposàvem del software necessari.

L'anàlisi hematològica és una part essencial pel diagnòstic i la gestió clínica de les aus per avaluar la seva salut, la progressió d'una malaltia i la seva resposta al tractament. Per analitzar mostres de sang aviària, el recompte de cèl·lules amb comptadors automàtics utilitzat en mamífers no és fiable perquè totes les cèl·lules de la sang aviària són nucleades. Aquests sistemes automàtics de recompte cel·lular estan basats en impedància elèctrica i els nuclis dels eritròcits aviaris interfereixen amb els dels leucòcits després de la lisi de les cèl·lules. Per tant, el recompte d'eritròcits i leucòcits de les aus encara es fa manualment amb el mètode Natt-Herrick (Natt, M.P., Herrick, C.A. A new blood diluent for counting erythrocytes and leucocytes of the chicken. *Poult Sci* 1952, 31: 735–738). Tot i que fa més de 60 anys que es va desenvolupar aquesta tècnica, encara avui dia segueix sent la tècnica de referència (Campbell, T,W. 2015. *Exotic animal haematology and cytology*. 4th Ed. John Wiley and Sons, Ames, Iowa, 402 pp.). No obstant això, l'existència d'un nou software en fase de proves per aquest comptador automàtic Sysmex, obre noves possibilitats de futur.

En el nostre estudi, als resultats exposats a la Taula 1 podem observar com els recomptes eritrocitaris i leucocitaris, comparant la tècnica manual amb l'automàtica, van mostrar considerables diferències. El recompte manual en aus, tot i ser el mètode de referència, presenta molta imprecisió i variabilitat analítica. Els resultats obtinguts indiquen una desviació estàndard molt elevada, en comparació amb el mètode automàtic.

Pel recompte automàtic d'eritròcits, com que es basa en la mida cel·lular, els resultats obtinguts els considerem més fiables que els realitzats amb el recompte manual. A més, observem una desviació estàndard molt menor.

Com era d'esperar, la presència de nucli als eritròcits aviaris interfereix amb el recompte dels leucòcits després de la lisi de les cèl·lules i els resultats no són vàlids. Per tant, el recompte manual de leucòcits el considerem el vàlid. No obstant això, podem comprovar la poca precisió de la tècnica a l'observar una desviació estàndard molt elevada.

En el cas de l'hematòcrit, el mètode de referència és el manual. Podem observar com el valor calculat automàticament es desvia molt del mètode considerat estàndard. Tot i que sabíem per avançat que la tècnica manual per la determinació de l'hematòcrit és la de referència, incloem per comparar els resultats proporcionats pel comptador Sysmex perquè s'analitzen simultàniament tots els paràmetres. Es pot veure clarament com aquests no són fiables i donen uns valors quasi incompatible amb la vida d'un animal.

Si comparem els intervals de referència de la bibliografia amb els nostres resultats observem que aquests es troben dins del rang de la normalitat descrits. Tot i que alguns individus mostren valors d'hematòcrit lleugerament més baixos dels publicats a la bibliografia, són bastant similars als obtinguts a la resta de voltors i entren dins del rang de la normalitat. On si es troben diferències és en els valors del recompte de leucòcits, que són considerablement més elevats en els voltors del nostre estudi. Donat que és un fet que es dona en la pràctica totalitat dels animals mostrejats, és del tot probable que aquest increment tingui relació amb l'estrés de la captura, ja que en ocasions poden estar a la gàbia de captura durant unes quantes hores. En aquest cas, cal minimitzar el temps de tancament a la gàbia i el temps de maneig per l'anellament i presa de mostres.

Els resultats obtinguts en aquest segon apartat els volíem presentar al "69th Wildlife Disease Association (WDA) / 14th European Wildlife Disease Association Joint Conference", que en un principi s'havia de celebrar del 31 d'agost al 5 de setembre a Cuenca. Donada la situació actual relacionada amb la COVID-19, aquest congrés s'ha ajornat.

6. Conclusions

Hi ha un consens general sobre la necessitat de fer una avaluació del risc que els medicaments veterinaris entrin a la cadena tròfica dels animals salvatges a través de la carronya, en particular per les espècies que s'alimenten d'animals morts, com els voltors. El registre de diclofenac com a medicament veterinari a Espanya l'any 2013 ha anat acompanyat d'un etiquetatge i una sèrie de consells per intentar evitar que la carronya estigui a l'abast de la fauna salvatge. No obstant això, tot i que en el present estudi no hem detectat la presència d'AINEs en els 136 voltors vius analitzats, degut a la seva curta vida mitja d'eliminació en sang, sí que hem pogut constatar en el marc d'un estudi paral·lel com els voltors tenen accés a carronya que conté diclofenac i d'altres AINEs, cosa que suggereix que (en almenys alguns casos), la normativa actual no està sent efectiva. Aquest escenari pot suposar un risc important per als voltors si l'ús d'aquests AINEs augmentés a Espanya. No només el diclofenac és tòxic pels voltors, sinó que hem pogut constatar com la flunixinina també és tòxica pel voltor. Es requereixen més dades sobre la toxicitat i l'exposició dels voltors als AINEs a Espanya, així com una comprensió més sòlida de la toxicitat d'aquests medicaments per aquestes espècies per evitar el risc d'un altre desastre ecològic com ha passat a l'Àsia.

S'estima que l'exposició de les aus carronyaires a medicaments presents en els cadàvers d'animals domèstics augmenti en el futur degut al creixement del bestiar produït en règim intensiu. Aquest tipus de ramaderia requereix de nombrosos tractaments veterinaris, pel que serà un aspecte molt rellevant pels punts d'alimentació suplementària per aus carronyaires, que són una eina important per a la conservació d'aquestes espècies. Caldrà controlar escrupolosament que l'aliment que es proporciona a les aus carronyaires no sigui portador de residus de medicaments.

Els resultats de l'estudi hematològic són útils com a eines de diagnòstic complementàries en l'avaluació de la salut dels rapinyaires. L'estat sanitari dels voltors analitzats és bo i les úniques alteracions trobades tenen relació amb l'estrés de la captura i engabiament durant un període llarg de temps abans del seu marcatge i mostreig, pel que recomanem minimitzar aquest temps al màxim.

7. Justificació econòmica

Despeses d'activitats	
- Anàlisis toxicològiques i sanguínies	1.500 €
- Enviament de mostres sanguínies al “Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos”, Ciudad Real)	0 €
- Viatges i dietes Viatges a l'abocador d'Orís (Osona)	116,44 €
- Material de laboratori fungible per l'extracció i anàlisi de les mostres sanguínies	225,49 €
Sou parcial d'un tècnic de suport a la recerca	4.158,07 €
TOTAL	6.000 €

Annex 1. Resum de la publicació enviada a la revista "Environmental International" (es prega mantenir la **confidencialitat** d'aquesta informació fins a la seva acceptació per publicació).

Despite the now well recognised impact of diclofenac on Asian vultures, this non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) was registered in 2013 for livestock treatment in Spain, Europe's main vulture stronghold. We assessed the risk of exposure to diclofenac and nine other NSAIDs in avian scavengers in the Iberian Peninsula following diclofenac commercialization. We sampled 228 livestock carcasses from vulture feeding sites, primarily pig (n = 156) and sheep (n = 45). We also sampled 389 avian scavenger carcasses (306 griffon vultures, 15 cinereous vultures, 11 Egyptian vultures, 12 bearded vultures and 45 other facultative scavengers) and 184 live birds (136 griffon vultures, 19 bearded vultures and 29 red kites). Samples were analysed by liquid chromatography with mass spectrometry. Seven livestock carcasses (3.07%) contained NSAID residues: flunixin (1.75%), ketoprofen, diclofenac and meloxicam (0.44% each). Fourteen dead avian scavengers (3.60%) had NSAID residues in kidney and liver, specifically flunixin (1.03%, two cases with visceral gout) and meloxicam (2.57%). No live vultures had NSAID residues in blood. To date, diclofenac poisoning has not been observed in Spain and Portugal, however, flunixin would appear to pose the most immediate and clearest risk. This work supports the need for well managed carrion disposal, alongside risk labelling on veterinary NSAIDs, especially diclofenac and flunixin.

Annex 2. Iconografia.

Figura 1. Gàbia de captura a l'abocador d'Orís (Osona).



Figura 2. Voltors capturats a dins la gàbia de captura.

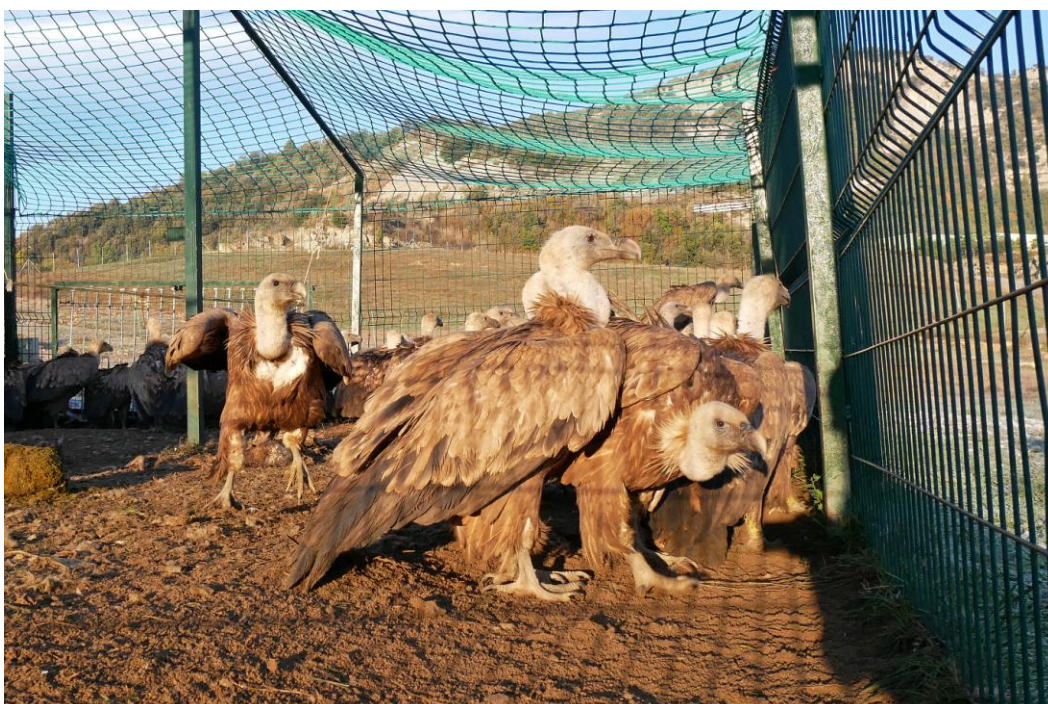


Figura 3. Presa de mostres sanguínies de voltor comú a la trampa de l'abocador d'Orís (Osona).



Figura 4. Alliberament d'un voltor després del seu marcatge i presa de mostres.

