



Facultad de Veterinaria

Trabajo de
Fin de Grado

Estudio serológico retrospectivo de enfermedades virales en aves simpátricas en centros de cría de hubaras (*Chlamydotis undulata*) en Marruecos

David Boso Dafonte

Grado en Veterinaria

Año 2024

Modalidad del Trabajo: Experimental

Licencia

Excepto donde se haga constar explícitamente, esta obra pertenece a David Boso Dafonte y está bajo una licencia de Reconocimiento-Compartir Igual 4.0 Internacional de Creative Commons.

Para ver una copia de esta licencia visite <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>



Agradecimientos

Los fondos y las muestras utilizadas en este estudio fueron proporcionados por el Fondo Internacional para la Conservación de la Hubara (IFHC). Agradecemos a Su Alteza el Jeque Mohamed bin Zayed Al Nahyan, Presidente de los Emiratos Árabes Unidos y fundador de IFHC, a Su Alteza el Jeque Theyab bin Mohamed Al Nahyan, Presidente de IFHC, y a Su Excelencia Mohammed Ahmed Al Bowardi, Vicepresidente, por su apoyo. Este estudio se realizó bajo la dirección de Reneco International Wildlife Consultants LLC, una empresa consultora que gestiona los programas de conservación de IFHC. Agradecemos al Dr. Frédéric Lacroix, Director General de Reneco, por su supervisión, así como a todo el personal de Reneco que participó en la recopilación de datos.

Resumen: Se ha registrado que las aves silvestres pueden ser reservorios de ciertas enfermedades virales, jugando un papel importante en su transmisión y mantenimiento. La circulación de estas enfermedades en los centros de cría de la avutarda hubara africana (*Chlamydotis undulata*) en Marruecos puede suponer una amenaza para su conservación. Estos centros, al estar ubicados en zonas remotas y áridas y contar con recursos que pueden ser utilizados por las aves silvestres, pueden actuar como zonas de concentración y/o de parada durante las migraciones. Esta situación podría favorecer la interacción entre las poblaciones residentes, migratorias y las propias hubaras, por lo que la presencia de aves silvestres cerca de las instalaciones puede suponer un factor de riesgo para la transmisión de enfermedades virales a las hubaras. Teniendo en cuenta en esto, se decidió investigar la circulación de las principales enfermedades virales con presencia demostrada en el territorio, eligiéndose los virus de la influenza aviar A (VIA), de la enfermedad de Newcastle (VEN) y del Nilo Occidental (VNO).

Para ello se analizaron 1362 muestras de 26 especies diferentes de aves silvestres, 76 de domésticas y de 15573 hubaras centinelas, en tres puntos de la provincia de Boulemane, en la región de Fès-Meknès, en Marruecos, a lo largo de 11 años, tanto de especies silvestres como domésticas. Para evaluar la circulación de las enfermedades y la presencia de anticuerpos neutralizantes, se obtuvo el suero de los individuos muestreados y se analizó mediante test de inhibición de hemoaglutinación (HI) para VIA y VEN, y enzimoinmunoanálisis de adsorción (c-ELISA) para el VNO.

Se constató la circulación de los tres virus estudiados (VIA, VEN y VNO) en aves silvestres en centros de cría y conservación de hubara de Marruecos. También se detectó la presencia de anticuerpos frente a VIA y VEN en aves de corral en un pueblo cercano a uno de los centros.

La alta seroprevalencia de IA y EN detectada en domésticas puede favorecer la infección de las aves silvestres, que podrían actuar como hospedadores puente entre las zonas rurales y los centros de hubaras. Como estas enfermedades pueden afectar a la especie y repercutir negativamente en su conservación, sería de gran importancia seguir llevando a cabo la monitorización y seguimiento de las enfermedades de las aves silvestres y domésticas para poder detectar cuanto antes cualquier riesgo que amenace la conservación de la especie.

Palabras clave: seroprevalencia, virus de la influenza aviar, virus de la enfermedad de Newcastle, virus del Nilo Occidental, aves silvestres, avutarda hubara.

Resumo: Rexistrouse que as aves silvestres poden ser reservorios de certas enfermidades virais, xogando un papel importante na súa transmisión e mantemento. A circulación destas enfermidades nos centros de cría da hubara (*Chlamydotis undulata*) en Marrocos pode supoñer unha ameaza para a súa conservación. Estes centros, ao estar situados en zonas remotas e áridas e contar con recursos que poden ser utilizados polas aves silvestres, poden actuar como zonas de concentración e/ou de parada durante as migracións. Esta situación podería favorecer a interacción entre as poboacións residentes, migratorias e as propias hubaras, polo que a presenza de aves silvestres preto das instalacións pode supoñer un factor de risco para a transmisión de enfermidades virais ás hubaras. Tendo en conta isto, decidiuse investigar a circulación das principais enfermidades virais con presenza demostrada no territorio, elixíndose os virus da influenza aviar A (VIA), da enfermidade de Newcastle (VEN) e do Nilo Occidental (VNO).

Para iso, analizáronse 1362 mostras de 26 especies diferentes de aves silvestres, 76 de domésticas e de 15573 hubaras centinelas, en tres puntos da provincia de Boulemane, na rexión de Fès-Meknès, en Marrocos, ao longo de 11 anos, tanto de especies silvestres como domésticas. Para avaliar a circulación das enfermidades e a presenza de anticorpos neutralizantes, obtívose o soro dos individuos mostreados e analizouse mediante test de inhibición de hemaglutinación (HI) para VIA e VEN, e enzimoimmunoanálise de adsorción (c-ELISA) para o VNO.

Constatouse a circulación de los tres virus estudiados (VIA, VEN e VNO) en aves silvestres en centros de cría e conservación de hubara de Marrocos. Tamén se detectou a presenza de anticorpos fronte a VIA e VEN en aves de curral nunha aldea preto dun dos centros.

A alta seroprevalencia de IA e EN detectada en aves domésticas pode favorecer a infección das aves silvestres, que poderían actuar como hospedadores ponte entre as zonas rurais e os centros de hubaras. Como estas enfermidades poden afectar á especie e repercutir negativamente na súa conservación, sería de gran importancia seguir levando a cabo a monitorización e seguimento das enfermidades das aves silvestres e domésticas para poder detectar canto antes calquera risco que ameace a conservación da especie.

Palabras clave: seroprevalencia, virus da influenza aviar, virus da enfermidade de Newcastle, virus do Nilo Occidental, aves silvestres, hubara.

Abstract: Wild birds have been reported to act as reservoirs for certain viral diseases, playing a significant role in their transmission and maintenance. The circulation of these diseases in the breeding centers of the African houbara bustard (*Chlamydotis undulata*) in Morocco could pose a threat to their conservation. These centers, located in remote and arid areas with resources that can be utilized by wild birds, may serve as concentration and/or stopover points during migrations. This situation could promote interaction among resident, migratory populations, and the houbara themselves, making the presence of wild birds near the facilities a risk factor for viral disease transmission to the houbara. Considering this, it was decided to investigate the circulation of the main viral diseases present in the area, selecting avian influenza virus A (AIV), Newcastle disease virus (NDV), and West Nile virus (WNV).

To this end, 1,362 samples from 26 different species of wild birds, 76 from domestic birds, and 15,573 sentinel houbaras were analysed at three locations in the Boulemane province, Fès-Meknès region, in Morocco, over 11 years, including both wild and domestic species. To assess the circulation of diseases and the presence of neutralizing antibodies, serum was obtained from the sampled individuals and analysed using hemagglutination inhibition (HI) tests for AIV and NDV, and competitive enzyme-linked immunosorbent assay (c-ELISA) for WNV.

The circulation of the three viral diseases studied (AIV, NDV and WNV) in wild birds in houbara breeding and conservation centers in Morocco was confirmed. Antibodies against AIV and NDV were also detected in poultry in a village near one of the centers. The high seroprevalence of AIV and NDV detected in domestic birds could facilitate the infection of wild birds, which could act as bridge hosts between rural areas and the houbara centers. Since these diseases can affect the species and negatively impact their conservation, it is of great importance to continue monitoring and tracking diseases in wild and domestic birds to detect any risk that may threaten the conservation of the species as early as possible.

Keywords: seroprevalence, avian influenza virus, Newcastle disease virus, West Nile virus, wild birds, houbara bustard.

ABREVIATURAS

APMV-1 – Paramyxovirus aviar tipo 1

DIVA – Diferencias entre animales infectados y vacunados

ECWP – Emirates Center for Wildlife Propagation

ELISA – enzimoimmunoanálisis de adsorción

EN – enfermedad de Newcastle

FNO – fiebre del Nilo Occidental

HA – hemaglutinina

HI – inhibición de hemoaglutinación

IA – influenza aviar

IC – intervalo de confianza

KM – kilómetro

ML – mililitro

NA – neuroaminidasa

PBS – tampón fosfato salino

PFU – unidad formadora de placas

RDE – Receptor Destroying Enzyme

VEN – virus de enfermedad de Newcastle

VIA – virus de influenza aviar

VIAAP – virus de influenza aviar de alta patogenicidad

VIABP – virus de influenza aviar de baja patogenicidad

VNO – virus del Nilo Occidental

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1. Influenza aviar	8
1.2. Enfermedad de Newcastle	10
1.3. Fiebre del Nilo Occidental.....	13
2. OBJETIVOS.....	14
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	14
3.1. Área y período de estudio.....	14
3.2. Método y recogida de muestras	16
3.3. Análisis serológicos	18
3.3.1. Ensayo de inhibición de la hemaglutinación (IH).....	18
4. RESULTADOS.....	22
4.1. Seroprevalencia globales por enfermedades	22
4.2. Estudio epidemiológico en aves silvestres	24
4.3. Estudio epidemiológico en aves domésticas.....	27
4.4. Estudio epidemiológico en aves centinelas.....	28
5. DISCUSIÓN.....	29
6. CONCLUSIONES.....	32
7. BIBLIOGRAFÍA.....	33

1. INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se ha puesto de manifiesto la importancia de la vigilancia y el control de las enfermedades en la fauna silvestre, por su impacto tanto en la salud humana como en la de animales de producción (González-Barrio, 2022; Mazzamuto et al., 2022), como por su interés en el conocimiento del propio estado sanitario de las poblaciones salvajes. A pesar de la dificultad de monitorizar estas poblaciones debido a que sus movimientos no están limitados y que se pueden llegar a desplazar grandes distancias, Mörner et al. (2002) señala que aquellos países que llevan a cabo una vigilancia sanitaria de las poblaciones de fauna salvaje cuentan con más probabilidades para detectar la presencia de enfermedades infecciosas, que puedan llegar afectar al hombre o a los animales domésticos, con posibles consecuencias zoonóticas y/o económicas (Kappes et al., 2023). Del mismo modo, esto permite implementar medidas de control y profilaxis de una manera rápida.

Muchas especies pertenecientes a diversos grupos taxonómicos realizan grandes desplazamientos estacionales motivados por múltiples causas (como alimento, clima propicio, reproducción...), llegando a cruzar continentes o hemisferios enteros. Durante este viaje pasan por diferentes zonas, hábitats, etc, facilitando la diseminación y transmisión de patógenos a otras áreas (Altizer et al., 2011). Respecto a las aves, aproximadamente el 20% de las especies actuales son migratorias (Somveille et al., 2013), llevando a cabo movimientos cíclicos regulares más allá de su área de reproducción, principalmente desde el norte y el este de Europa al sur de Europa y África, así como desde norte de América al centro y sur. Existen zonas de especial interés, llamadas corredores migratorios, como el estrecho de Gibraltar o el Bósforo, donde se llegan a concentrar numerosas especies (Contreras et al., 2016). Además, en su recorrido realizan paradas para descansar o alimentarse, pudiendo entrar en contacto con las poblaciones de aves domésticas y las silvestres sedentarias de esas zonas, aumentando el riesgo de transmisión intra e interespecie de patógenos (Olsen et al., 2006). Aun así, las migraciones de larga distancia, con unas altas demandas energéticas y estrés que comprometen al sistema inmune, también pueden ayudar a disminuir la prevalencia de los patógenos, eliminando a aquellos ejemplares más debilitados, aunque la inmunosupresión asociada a la migración es variable según la especie (Altizer et al., 2011).

Las aves silvestres pueden llegar a transmitir numerosos patógenos que pueden afectar a las especies de avicultura por su estrecho parentesco filogenético, actuando como hospedadores naturales, reservorio, hospedadores puente o transportando artrópodos vectores durante la migración (Contreras et al., 2016). Dentro de la lista de patógenos potencialmente transmisibles por las aves se encuentran patógenos que afectan al ser humano, como el virus de la influenza aviar (Verhagen et al., 2015), o que pueden llegar a hacerlo, como diferentes coronavirus (Wille & Holmes, 2020). En este sentido, la interrelación de las enfermedades entre las aves de corral y

las silvestres es una de las más estudiadas (Wiethoelter et al., 2015), sobre todo a raíz de la expansión del virus de influenza aviar subtipo H5N1 altamente patógeno. Al entrar en contacto las aves silvestres con los animales domésticos o con el ser humano, éstas pueden ser utilizadas como centinelas de patógenos zoonóticos (Martín-Maldonado et al., 2022; Reed et al., 2003), como también para otros estudios, como resistencias a antibióticos (Martín-Maldonado et al., 2022), contaminantes y/o tóxicos (Guerra et al., 2011; Gurney et al., 2005), así como el estado de los hábitats (Smits et al., 2005).

De igual modo que en las explotaciones avícolas existen fuertes medidas de bioseguridad, para minimizar el riesgo de entrada y transmisión de patógenos, garantizando el bienestar animal y la seguridad alimentaria (Tilli et al., 2022), los centros de cría y reproducción de la avutarda hubara africana (*Chlamydotis undulata*) [Figura 1], en Marruecos cuentan con medidas para evitar la entrada y la exposición a éstos. Esta especie está catalogada como Vulnerable por la IUCN, estando legalmente protegida en el país. Entre las amenazas que enfrenta se encuentra la degradación de los entornos que habita, tanto por la acción humana como el cambio climático, así como la presión cinegética. Debido al declive de su población, se ha creado un proyecto *exsitu* en Marruecos de International Found for Houbara Conservation (IHFC). Este proyecto, llamado Emirates Center for Wildlife Propagation (ECWP), tiene dos centros: Missouri y Enjil, donde se lleva a cabo su reproducción en cautividad para reforzar las poblaciones silvestres. El contacto entre las hubaras y las aves silvestres es posible, se lleva a cabo su reproducción en cautividad para reforzar las poblaciones silvestres. Aun así, el contacto entre las hubaras y las aves silvestres es posible, a pesar de que se toman las máximas medidas posibles para evitar que suceda, como limitar el acceso a las jaulas, con redes con un tamaño de agujero que no permita el acceso al interior; no dejar alimento, agua o residuos al alcance de las aves silvestres o controlar que no nidifiquen dentro de las instalaciones.

Las hubaras son susceptibles a la influenza aviar (IA) y a la enfermedad de Newcastle (EN), dos enfermedades infecciosas altamente contagiosas y con casos en otras zonas cercanas a los centros de Marruecos en los últimos años (Bidoudan et al., 2023; Fagrach et al., 2023). Otra enfermedad infecciosa que puede llegar a afectar a esta especie, y en la que las aves silvestres juegan también un papel importante en su transmisión, es la fiebre del Nilo Occidental (FNO), con circulación demostrada en el país (Assaid et al., 2021). Estas enfermedades pueden afectar al éxito del programa de cría y conservación de la especie, por lo que resulta importante conocer su circulación en las diferentes poblaciones de aves de la zona, incluyendo silvestre, domésticas o las propias hubaras de los centros.



Figura 1. Avutarda hubara africana (*C. undulata*) en libertad (David Boso Dafonte).

1.1. Influenza aviar

Según la Organización Mundial de Sanidad Animal, (2021a), de aquí en adelante OMSA, la IA está causada por la infección por un virus del género *Influenzavirus A* de la familia *Orthomyxoviridae*. A pesar de que hay otros géneros en la familia, sólo los virus de influenza A infectan a las aves. Se trata de virus ARN envueltos monocatenarios de sentido negativo, con el genoma dividido en 8 segmentos. Esta característica es la que les permite que experimenten rápidos cambios genéticos al mezclarse diferentes cepas (Pattison et al., 2008).

Los virus de influenza aviar (VIAs) se clasifican en subtipos basándose en las dos proteínas de superficie, la hemaglutinina (H) y la neuroaminidasa (N), que presentan gran variación. Hasta el momento se han encontrado 18 tipos de hemaglutinina y 11 de neuroaminidasa, identificándose 16 (H1-16) y 9 (N1-N9) de ellas, respectivamente, en aves, mientras que el resto en murciélagos (H17-18 y N10-11) (Sarker et al., 2017). De acuerdo a su virulencia en aves de corral, la OMSA (2018) establece una clasificación:

- Influenza aviar de alta patogenicidad (IAAP): los subtipos H5 o H7 o cualquier otro que presente un índice de patogenicidad intravenosa superior a 1,2 o con una mortalidad del 75%. Producen una enfermedad clínica aguda y severa en pollos y pavos, cursando con gran mortalidad, siendo ésta variable en otras especies.
- Influenza aviar de baja patogenicidad (IABP): aquellos subtipos H5 y H7 que no cumplan los anteriores criterios, y el resto de combinaciones. Causan una infección asintomática o con signos respiratorios moderados.

En cuanto al cuadro lesional, los casos más graves pueden presentarse diversas lesiones congestivas y hemorrágicas en piel, hígado, bazo, corazón u otros órganos [Figura 2], aunque en aves que mueren súbitamente pueden estar ausentes. Los virus de influenza de baja patogenicidad (VIABP) suelen estar asociados con lesiones a nivel de las vías respiratorias, sobre todo sinusitis, con exudados que varían de mucopurulentos a caseosos. Mientras que en infecciones por virus de influenza aviar de alta patogenicidad (VIAAP) pueden aparecer lesiones como edema, hemorragias y focos necróticos en órganos viscerales (Pattison et al., 2008).

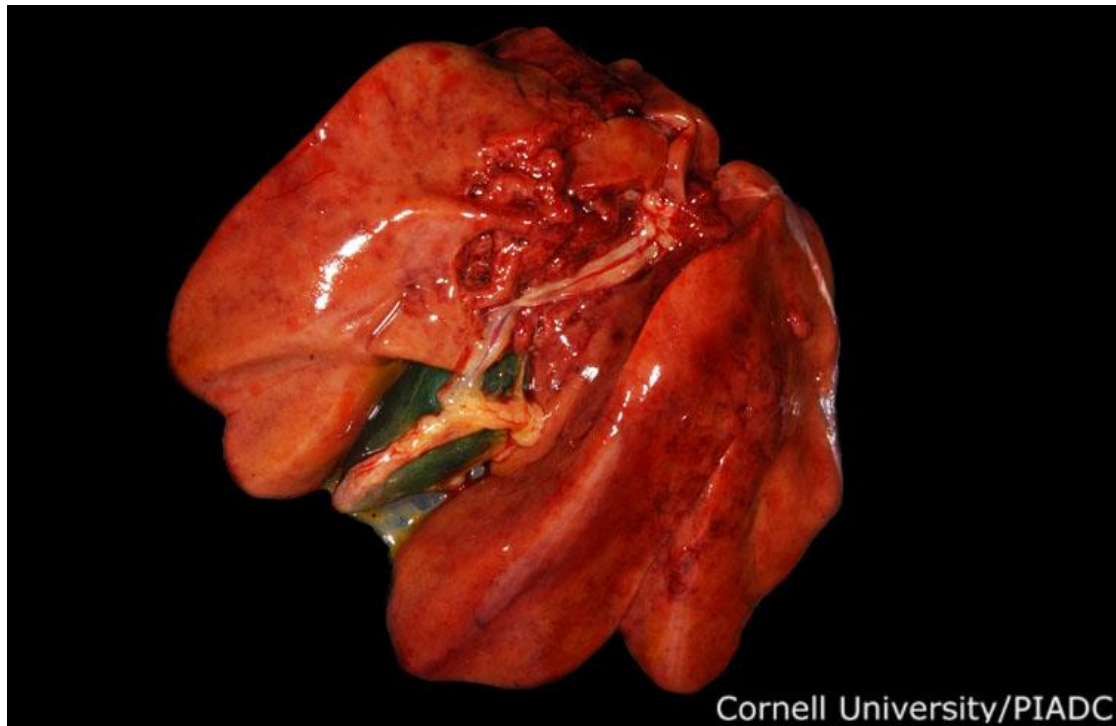


Figura 2. Hígado de pollo, con múltiples focos hemorrágicos agudos (Buckles et al., 2013).

Además de los VIAAP, algunos subtipos de VIABP, como el H9N2, han demostrado la capacidad para traspasar la barrera interespecie y multiplicarse en mamíferos, como visones (Agüero et al., 2023), focas y leones marinos (Gamarrá-Toledo et al., 2023; Lair et al., 2024), cerdos (Ma et al., 2009), entre otros, además de al ser humano (OMSA, 2021a). Los VIAAP están incluidos la lista de enfermedades de declaración obligatoria (OMSA, 2023).

Aunque se ha detectado en un gran número de especies, las aves acuáticas, principalmente las del orden Anseriformes (patos, gansos, cisnes, etc) pero también las del orden Charadriiformes (limícolas, gaviotas, charranes, etc), se consideran el reservorio natural de los VIA, sobre todo los VIABP (Hassan et al., 2017), existiendo variabilidad en los subtipos que porta cada grupo (Venkatesh et al., 2018). Las aves de corral se consideran el principal reservorio de los VIAAP, difundiendo las aves silvestres estos subtipos a otras zonas a grandes distancias durante la migración, luego de haber estado en contacto con las aves domésticas (Xu et al., 2016). Varios estudios (Ferro et al., 2010; Gass et al., 2023; Verhagen et al., 2014) consideran que los VIA se

mantienen en las poblaciones silvestres debido a una circulación continua en una parte de la población y a los movimientos migratorios, existiendo intercambio de subtipos entre los ejemplares residentes y migratorios en las áreas de invernada, pudiendo surgir nuevas cepas. En cuanto a otros órdenes de aves terrestres, sobre todo Passeriformes, la prevalencia es baja (Hassan et al., 2017), por lo que podrían actuar como hospedadores puente, infectándose a partir del contacto con aves de corral o acuáticas y dispersando el virus entre las granjas y/o a las poblaciones silvestres.

La vía fecal-oral es la principal vía de transmisión horizontal, entre aves, mostrando las partículas víricas una gran estabilidad en las heces. Además, la persistencia que presenta el virus en aguas superficiales con temperaturas en torno a 0°C y con pH neutro permite que pueda permanecer viable durante varias semanas, incluso meses (Blagodatski et al., 2021). A pesar de que, en Anseriformes y aves de corral, la principal vía de excreción es a través de las heces, en Passeriformes no está tan claro. En diferentes estudios realizados con VIABPs, Boroomand et al. (2019) detectaron el virus únicamente en intestino y no en tráquea en gorriones comunes (*Passer domesticus*); Iqbal et al. (2013), tras infectar con virus H9N2 a gorriones comunes y otras especies, no encontraron diferencia entre la excreción por vía orofaríngea y cloacal; mientras que Nemeth et al. (2010), tras infectar también con H9N2 a gorriones comunes y estorninos europeos (*Sturnus vulgaris*), reportaron que la cantidad de virus excretada por la vía orofaríngea fue mayor que la cloacal. Esto podría explicarse debido a una diferente patogénesis en los distintos grupos de aves. Aun así, la duración y cantidad de virus excretado por Passeriformes fue mucho menor en comparación a Anseriformes y aves de corral. Otra posible fuente de infección descrita es por contacto con plumas con partículas víricas (Gutiérrez et al., 2011).

El control de la enfermedad se basa principalmente en la prevención mediante medidas de bioseguridad y un buen manejo, incluyendo situar las explotaciones o centros lejos de zonas con presencia de aves acuáticas, minimizar movimientos de las aves, evitar en la medida de lo posible el contacto con aves silvestres, correcta limpieza y desinfección tanto del personal como del material, etc. También se puede llevar a cabo la vacunación de las aves que protegen de los signos clínicos, aunque no eliminan por completo la posibilidad de infección y excreción del virus, aunque sí las reducen (Pattison et al., 2008).

1.2. Enfermedad de Newcastle

La EN está causada por cepas virulentas de ortoavulavirus aviar tipo 1 (AOAV-1), también llamado paramixovirus aviar tipo 1 (APMV-1), de la familia *Paramyxoviridae*. El VEN es un virus ARN envuelto, monocatenario de sentido negativo, que codifica 6 grandes proteínas (Zhu et al., 2010). Los paramixovirus aislados procedentes de distintas especies de aves se han clasificado mediante análisis serológicos y filogenéticos en 21 serotipos, que se designan como

AOAV-1 a AOAV-21, pero el responsable de causar la EN es el AOV-1 (OMSA, 2021b). Se trata de una enfermedad de declaración obligatoria (OMSA, 2023), supone una gran amenaza para el sector avícola debido a ser altamente contagiosa.

Una característica que destaca del VEN es su capacidad para causar distintos signos clínicos y de diversa gravedad, incluso en los mismos hospedadores. En base a esto, y aunque se pueden solapar, las diferentes cepas se agrupan en cinco patotipos en base a su patogenicidad en pollos:

1. Velogénico viscerotrópico: formas muy virulentas, en las que se observan frecuentemente lesiones hemorrágicas en el intestino.
2. Velogénico neurotrópico: cepas, al igual que las anteriores, altamente virulentas y que causan mortalidad elevada, mostrando signos respiratorios y nerviosos.
3. Mesogénico: cepas de virulencia intermedia, que causan enfermedad con signos respiratorios y, a veces, signos nerviosos con baja mortalidad.
4. Lentogénico respiratorio: cepas de baja virulencia que causan una infección respiratoria leve o subclínica.
5. Entérico subclínico: cursan como una infección entérica subclínica (Pattison et al., 2008).

Al igual que con la IA, no existen lesiones patognomónicas de la EN. Cuando existen signos clínicos respiratorios, se puede encontrar traqueítis o aerosaculitis, con posible congestión de los sacos aéreos. A nivel del aparato digestivo se pueden encontrar lesiones hemorrágicas, sobre todo en proventrículo [Figura 3] (Pattison et al., 2008).



Figura 3. Proventriculitis con múltiples hemorragias en broiler (Buckles et al., 2013).

Se ha detectado la infección en más de 200 especies de aves, aunque se sospecha que la práctica totalidad de las especies son susceptibles a la infección. La EN es mayoritariamente patógena en pollos y pavos, mientras que en otras aves de corral y aves de silvestres los signos clínicos son más leves o pueden estar ausentes (Inuwa et al., 2023).

Aunque tradicionalmente se ha asociado la virulencia a índices de patogenicidad intracerebral equivalentes o superiores a 0,7, actualmente se utiliza la secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión (F): al menos tres residuos de arginina o lisina entre las posiciones 113 y 116 en el extremo C-terminal de la proteína F2 y un residuo de fenilalanina en la posición 117 del extremo N-terminal de la proteína F1 (Zanetti et al., 2005).

En base a la secuencia del gen F, las cepas de AOA-1 se han clasificado en dos clases (I y II), con varios genotipos. En el caso de la clase I y de los genotipos I, II y X de la clase II están constituidas mayoritariamente por cepas avirulentas, aislándose de aves silvestres de todo el mundo, principalmente aves acuáticas, aunque también se han aislado en aves de corral, lo que indicaría una transmisión por parte de las aves silvestres a las domésticas (Kim et al., 2007). Aunque también se han encontrado cepas similares a las usadas por las vacunas de EN en aves silvestres (Wehmann et al., 1999).

Por otro lado, el resto de cepas englobadas en el resto de genotipos de la clase II son consideradas virulentas, siendo endémicas en aves de corral en muchos países del mundo, y encontrándose en aves silvestres también, pero mayoritariamente cerca o en las explotaciones avícolas infectadas. La única excepción hasta ahora de un reservorio de cepas virulentas en aves silvestres sería el aislamiento en cormoranes orejudos (*Phalacrocorax auritus*) en zonas de invernada de Estados Unidos (Alexander, 2011).

La principal de transmisión es por contacto directo con aves infectadas, que eliminarían el virus a través de las heces y secreciones respiratorias; en menor medida, contacto con fómites contaminados (Al-Rasheed, 2024). Especialmente se cree que las aves acuáticas podrían jugar un papel importante en la epidemiología de la enfermedad, al eliminar el virus en zonas húmedas que favorecen su estabilidad, así como favorecer su diseminación a otras áreas a través de los movimientos migratorios (Jørgensen et al., 2004). De hecho, esto se vería apoyado por un reciente estudio en Zambia, donde Kalonda et al. (2024) encontraron que las cepas aisladas de cepas de EN, en aves acuáticas migratorias, estaban muy relacionadas con cepas aisladas en Europa y Asia. Snoeck et al. (2013) también señalan que aves como los gorriones, que viven cerca de las aves domésticas, pueden jugar un papel en la transmisión, actuando como hospedadores puente.

Las mismas medidas de control y profilaxis empleadas en la prevención de la IA pueden ser aplicadas para el caso de la EN, con un importante protocolo de bioseguridad (Pattison et al., 2008).

1.3. Fiebre del Nilo Occidental

El género *Flavivirus* (familia *Flaviviridae*) incluye numerosos patógenos zoonóticos, como el virus del Nilo Occidental (VNO), virus Usutu (VUSU), virus del dengue, virus de la fiebre amarilla, entre otros; o la capacidad de serlo, como el virus Bagaza (VBAG), transmitidos por mosquitos (Napp et al., 2021; Weissenböck et al., 2010).

De ellos, el VNO es el agente etiológico de la FNO, enfermedad vírica que puede afectar aves, humanos y caballos. Actualmente se encuentra distribuida por en todo mundo, excepto en la Antártida, causando brotes epidémicos. (Islam et al., 2020). El análisis genético de las cepas del virus permite clasificarlas en múltiples estirpes, encontrándose la estirpe 1 principalmente en África central y del norte, Oriente Medio, Europa, subcontinente indio, Australia y América del norte y central, además de Colombia y Argentina; mientras que la estirpe 2 es endémica en África central y del sur y en Madagascar, aunque se ha reportado su presencia también en países de Europa. Recientemente, se ha propuesto que existen 7 linajes distintos (OMSA, 2021b; Seidowski et al., 2010).

Los signos clínicos están relacionados con la invasión del sistema nervioso central, así como otros órganos como páncreas, hígado o bazo, aunque las lesiones macroscópicas suelen ser mínimas o estar ausentes, sobre todo en aquellas aves más susceptibles, como los córvidos (Pérez-Ramírez et al., 2014).

El ciclo de transmisión natural se produce entre vectores artrópodos hematófagos, principalmente mosquitos ornitófilos del género *Culex* spp., pero también otras especies de otros géneros, como *Aedes albopictus*, y aves domésticas y silvestres, que actúan como reservorio y amplificadores. A pesar de que los humanos y caballos pueden manifestar signos clínicos, son considerados como hospedadores de fondo de saco (Yildirim et al., 2018). Aunque también se han encontrado seropositividad en pequeños mamíferos (Benjelloun et al., 2016), no hay evidencia que otro grupo que no sean las aves puedan actuar como hospedadores amplificadores, replicándose el virus eficientemente en ellas y llegando a una viremia lo suficiente alta (10^{4-5} pfu/ml) capaz de infectar a los mosquitos al alimentarse de las aves. Existe variabilidad en la patogenicidad según la especie (la familia Corvidae es la más sensible), pero también en la intensidad y duración de la viremia (hasta 5 días en gorriones), siendo los hospedadores más competentes las especies pertenecientes a los órdenes Passeriformes y Charadriiformes (Pérez-Ramírez et al., 2014; Rappole & Hubálek, 2003), aunque también se ha señalado a los Anseriformes como hospedadores adecuados (Yeh et al., 2011).

Además de que las aves pueden transportar el virus durante sus rutas migratorias y ser capaces de transmitirlo a las aves residentes por vía oro fecal (Ain-Najwa et al., 2020) apareciendo el virus en nuevas zonas, éste también se mantiene por transmisión vertical en los mosquitos, desde la

hembra a la descendencia. Por ello las altas temperaturas favorecen que el ciclo se complete más rápido e incrementen la supervivencia de la hembra, lo que se traduce en una mayor abundancia de vectores competentes, que se correlaciona positivamente con la seroprevalencia detectada en aves, según un estudio de Martínez-de La Puente et al. (2018).

Cabe destacar que los virus Usutu y Bagaza comparten a las aves como reservorio con el VNO, siendo endémicos de África y parte de Asia, pero apareciendo brotes en otras zonas, como en Austria en 2001 o en España en 2010, respectivamente (Napp et al., 2021). Asimismo los anticuerpos que se generan frente a los diferentes *Flavivirus* pueden producir reacciones cruzadas en las pruebas serológicas, lo que puede dificultar el diagnóstico (Llorente et al., 2019).

La prevención y control de estos virus incluye el control de los vectores, tanto en el ambiente como controlando la exposición de las aves a éstos, así como la posibilidad de inmunoprofilaxis cuando el riesgo lo aconseje (Pattison et al., 2008).

2. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente estudio, dentro del plan de formación dual en colaboración con la empresa Reneco International Wildlife Consultants, es determinar si existe circulación de las tres enfermedades infecciosas (IA, EN y FNO) en aves silvestres de las proximidades de los centros de cría y reproducción de hubara, lo que supondría un riesgo para su conservación. Para alcanzar ese objetivo se determinará la seroprevalencia de las enfermedades tanto en las poblaciones silvestres como en la doméstica, contando también con los datos de hubaras centinelas de los centros; y se estudiará su evolución a lo largo del período comprendido entre 2011 y 2024.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Área y período de estudio

La zona de estudio se sitúa a cabo en la provincia de Bulmán, en la región de Fez-Mequinez, en Marruecos, donde se encuentran los dos centros de cría y conservación de avutarda hubara (*C. undulata*), gestionados por Reneco International Wildlife Consultants LLC, con el objetivo de garantizar la recuperación de una población viable de hubaras silvestres en el país. Ambos centros de cría (el ECWP de Missouri y el ECWP de Enjil) se encuentran separados por 60 km, y constituyen los principales puntos de muestreo, debido al interés de conocer si existía circulación vírica en las aves silvestres de los centros [Figura 4].

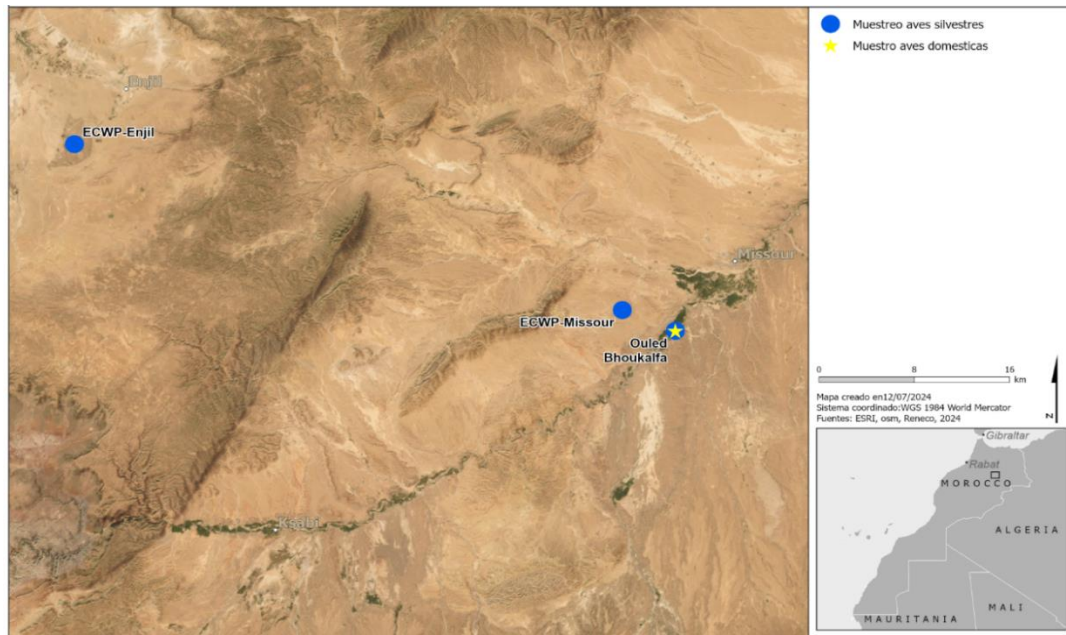


Figura 4. Zonas de captura y muestreo de aves para el estudio.

Como tercer punto de muestreo, se incluyó el pueblo de Ouled Bhoukalfa, por cercanía al centro de Missouri (4 km), donde además de aves silvestres, se pudieron tomar muestras de aves de corral, principalmente pollos/gallinas (*Gallus gallus domesticus*) y pavos (*Meleagris gallopavus domesticus*). La toma de muestras comenzó en 2021 porque no se obtuvieron los permisos para muestrear este tipo de aves hasta entonces. Estas aves se encuentran en condiciones de semilibertad, entrando en contacto con aves silvestres de la zona, y sin que se lleve a cabo ningún plan de vacunación de ninguna de las enfermedades estudiadas [Figura 5].



Figura 5. Uno de los gallineros muestreados en el pueblo de Bhoukalfa.

El área de estudio se caracteriza por un clima continental, con variaciones entre las diferentes zonas. La estación seca se extiende de mayo a octubre, concentrándose las lluvias entre noviembre

y abril, que apenas exceden los 250 mm. Missouri se encuentra sobre los 1200 metros sobre el nivel del mar, por lo cual las temperaturas suelen superar los 35° durante el día, con veranos muy calurosos, mientras que Enjil al encontrarse a mayor altitud (2000 msnm), las temperaturas son más moderadas, pero en invierno son frecuentes las heladas e incluso nieve en las áreas más altas.

La vegetación es escasa, predominando especialmente el esparto (*Stipa tenacissima*), junto a otras poáceas de bajo porte, a excepción de las zonas adyacentes a las aldeas, como Ouled Bhoukalfa, donde predominan pequeños bosques de olivos y frutales (Ministère de l'Interieur & Ministère de l'Habitat, 2013)

Las muestras analizadas fueron tomadas en un período comprendido entre los años 2011 y 2024, con la excepción de los años 2018 y 2019, donde no se disponía de muestras adecuadas ya que fueron utilizadas para otros estudios.

3.2. Método y recogida de muestras

En colaboración con el equipo de Ecología de Reneco Wildlife Consultants, el equipo veterinario de ECWP realiza muestreos periódicos de aves silvestres en los centros con fines de vigilancia. Se realizó la captura en campo de las aves silvestres gracias al permiso científico de captura y anillado en la región de Boulemane, expedido por la Agence National des Eaux et Forêts (ANEF). Se utilizaron redes de niebla, un sistema que consiste en el uso de redes o mallas que forman pliegues o bolsas donde caen las aves al chocar con ellas. Las redes, de 2,6 m de alto y 9 m de longitud, con una luz de la malla de 30 mm, se sostuvieron utilizando postes, de 3,5 m de alto, que se anclaron a su vez al suelo o a la vegetación circundante por medio de cuerdas [Figura 6]. Se colocaron temprano, cuando no hay apenas luz, sobre las 5-6 h de la mañana, en días con buen tiempo y se revisaron aproximadamente cada 30 minutos. Se colocó un número variable (entre 2 y 4) dependiendo del día de muestreo en distintas zonas o hábitats de los lugares de muestreo mencionados anteriormente.

A cada ejemplar capturado se le tomaban datos, como especie, sexo, edad (cuando era posible) y peso, y se le colocaba una anilla con un código asignado. Antes de liberarlo, se tomaba un hisopo de la cavidad oral y cloacal, además de extracción de sangre, preferentemente de la vena yugular derecha. El volumen de sangre, recolectado en un tubo Eppendorf, variaba en función del tamaño de la especie, pero no excedía el 1% del peso corporal, variando entre los 0,2 y 1,5 ml. Se conservaba mediante refrigeración con paquetes de hielo, permitiendo su coagulación, hasta su llegada al laboratorio, donde era centrifugada a 2000 rpm durante 5 minutos, para separar el suero de los elementos formes. El suero recuperado era almacenado en otro tubo Eppendorf y conservado a -20 °C hasta su posterior análisis.



Figura 6. Redes de niebla colocadas en distintos hábitats: A) En bosque de olivos cultivados. B) En la periferia de una zona de cultivos.

En total, se obtuvieron 1438 muestras de suero (866 en ECWP de Missouri, 452 en ECWP de Enjil y 120 en Bhoukalfa) de 28 especies de aves pertenecientes a 15 familias y 5 órdenes diferentes (Tabla 1), siguiendo nomenclatura taxonómica de la lista patrón de Clements (2023). De las cuales 1362 eran de aves silvestres y 76 de domésticas. Las Respecto al total y en los centros de cría y reproducción de hubara de Missouri y Enjil, la especie muestreada más abundante fue el gorrión común (*P. domesticus*), con 1057 (73%) muestras totales, y 638 (74%) en Missouri y 596 (88%) en Enjil. Mientras que en el pueblo de Bhoukalfa, el mayor número de muestras pertenecen a la especie *Gallus gallus domesticus*, con 65 muestras (54%). Respecto a las familias, la familia Passeridae fue la más muestreada, con 1246 (87%) muestras del total. Los órdenes Passeriformes y Galliformes representaron la práctica totalidad de las muestras, con 1351 (94%) y 76 (5%) muestras respectivamente.

Las especies silvestres también fueron subclasificadas en dos categorías: residentes, si permanecen la mayor parte del tiempo, además de reproducirse, en las zonas cercanas a los puntos de muestreo; o migratorias, si se desplazan a otras zonas para criar o pasar el invierno, lejos de los centros, o cruzan Marruecos durante su trayecto migratorio (Díaz et al., 1996; Tellería et al., 1999).

A mayores también se utilizaron los datos obtenidos de los controles serológicos de las aves centinelas de ambos centros. Se trata de hubaras no vacunadas, por lo que son susceptibles a estas enfermedades, y claramente identificadas. Se encuentran distribuidas en todos los recintos donde hay hubaras vacunadas. Los controles serológicos se llevan a cabo de forma rutinaria para la IA desde 2015, y para la EN desde 2007 (aunque solo se utilizaron los datos de años que corresponden con los años de muestreo de silvestres y domésticas), para controlar si estas enfermedades están presentes. En el caso de IA se analizaron 4414 sueros, no disponiendo de datos para el año 2023 debido a interferencias en el análisis de las muestras de ese año, mientras que para EN se analizaron 11429 sueros.

3.3. Análisis serológicos

3.3.1. Ensayo de inhibición de la hemaglutinación (IH)

Las muestras de suero fueron analizadas usando un test de inhibición de hemaglutinación (IH) para detectar la posible presencia de anticuerpos específicos de VEN y del subtipo VIABP H9N2, el circulante en Marruecos (Sikht et al., 2022). De las muestras totales de suero (n=1438), se analizaron 1438 para IA y 1112 para EN, debido a que, en algunos casos, la cantidad de suero no fue suficiente para ambos estudios.

Especie	Familia	Orden	Estatus	Total		Missour		Enjil		Bhoukalfa	
				a	f	A	f	a	f	a	f
<i>Passer domesticus</i>	Passeridae	Passeriformes	Residente	1057	0,7350	638	0,7367	396	0,8761	23	0,1917
<i>Passer hispaniolensis</i>	Passeridae	Passeriformes	Residente	161	0,1120	150	0,1732	10	0,0221	1	0,0083
<i>Gallus gallus domesticus</i>	Phasianidae	Galliformes	Doméstico	65	0,0452					65	0,5417
<i>Petronia petronia</i>	Passeridae	Passeriformes	Residente	28	0,0195			28	0,0619		
<i>Sturnus vulgaris</i>	Sturnidae	Passeriformes	Migratorio	27	0,0188	26	0,0300	1	0,0022		
<i>Galerida theklae</i>	Alaudidae	Passeriformes	Residente	23	0,0160	12	0,0139	11	0,0243		
<i>Meleagris gallopavo domesticus</i>	Phasianidae	Galliformes	Doméstico	11	0,0076					11	0,0917
<i>Turdus merula</i>	Turdidae	Passeriformes	Residente	10	0,0070	2	0,0023			8	0,0667
<i>Lanius excubitor</i>	Laniidae	Passeriformes	Residente	8	0,0056	7	0,0081			1	0,0083
<i>Streptopelia decaocto</i>	Columbidae	Columbiformes	Residente	7	0,0049	5	0,0058			2	0,0167
<i>Calandrella brachydactyla</i>	Alaudidae	Passeriformes	Residente	7	0,0049	4	0,0046	3	0,0066		,
<i>Sylvia hortensis</i>	Sylviidae	Passeriformes	Migratorio	5	0,0035	3	0,0035			2	0,0167
<i>Oenanthe deserti</i>	Muscicapidae	Passeriformes	Migratorio	4	0,0028	4	0,0046				
<i>Turdus philomelos</i>	Turdidae	Passeriformes	Migratorio	4	0,0028	4	0,0046				

<i>Oenanthe oenanthe</i>	Muscicapidae	Passeriformes	Migratorio	3	0,0021	3	0,0035				
<i>Chloris chloris</i>	Fringillidae	Passeriformes	Residente	2	0,0014					2	0,0167
<i>Columba livia</i>	Columbidae	Columbiformes	Residente	2	0,0014	2	0,0023				
<i>Erythropygia galactotes</i>	Muscicapidae	Passeriformes	Migratorio	2	0,0014	2	0,0023				
<i>Galerida cristata</i>	Alaudidae	Passeriformes	Residente	2	0,0014	1	0,0012	1	0,0022		
<i>Lanius senator</i>	Laniidae	Passeriformes	Migratorio	2	0,0014					2	0,0167
<i>Motacilla alba</i>	Motacillidae	Passeriformes	Residente	1	0,0007	1	0,0012				
<i>Acrocephalus scirpaceus</i>	Acrocephalidae	Passeriformes	Migratorio	1	0,0007	1	0,0012				
<i>Egretta garzetta</i>	Ardeidae	Pelecaniformes	Migratorio	1	0,0007	1	0,0012				
<i>Emberiza cirrus</i>	Emberizidae	Passeriformes	Residente	1	0,0007					1	0,0083
<i>Jynx torquilla</i>	Picidae	Piciformes	Migratorio	1	0,0007					1	0,0083
<i>Luscinia megarhynchos</i>	Muscicapidae	Passeriformes	Migratorio	1	0,0007					1	0,0083
<i>Oenanthe moesta</i>	Muscicapidae	Passeriformes	Residente	1	0,0007			1	0,0022		
<i>Sylvia atricapilla</i>	Sylviidae	Passeriformes	Residente	1	0,0007			1	0,0022		

Tabla 1. Clasificación de las especies capturadas durante el estudio, así como su abundancia (a) y frecuencia (f) totales y en los tres puntos de muestreo.

De este modo, y siguiendo lo establecido en los respectivos capítulos de las citadas enfermedades en el Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres de la OMSA (2021a; 2021b), se utilizaron placas de plástico de 96 micropocillos, utilizando como reactivos PBS isotónico 0,01M y pH 7,4 y suspensión al 1% de eritrocitos de pollo, identificada como seronegativa frente a las dos virus . Como antígeno para el VIA se utilizó una cepa H9N2 linaje G1, y para el VEN la cepa VG/VA (Villegas-Glisson/Georgia) Avinew, de la vacuna linaje G1, y para el VEN la cepa VG/VA (Villegas-Glisson/Georgia) Avinew, de la vacuna Avinew Boehringer-Ingelheim.

En el caso de los sueros analizados para VIA de aves silvestres diferentes a pollos, fue necesario un pretratamiento previo con Enzima Destructora de Receptores RDE (II) (Seiken®) durante 1 día a 37°C seguidos de inactivación a 56°C durante 30 minutos, para evitar reacciones de aglutinación inespecíficas.

En primer lugar, se realizó un test de hemaglutinación para determinar las unidades hemaglutinantes (UHA) de cada suspensión vírica. En el caso del VIA fueron 8 unidades hemaglutinantes (UHA) de virus y 4 UHA en el caso del VEN. Posteriormente, se determinaron los títulos de IH, como la mayor dilución de suero que inhibió la hemaglutinación de forma completa. Para el VIABP, sueros con títulos ≥ 16 unidades eran considerados como positivos a la presencia de anticuerpos anti-VIA. Mientras que para el VEN, sueros con títulos de IH ≥ 8 unidades eran considerados como positivos a la presencia de anticuerpos frente al VEN.

3.3.2. Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

Para detectar anticuerpos frente a VNO en el suero se utilizó un test ELISA (ID Screen West Nile Competition ELISA Kit, Innovative Diagnostics, ID Vet France). Se analizaron 111 muestras de las totales (n=1438), debido a que no había suficiente cantidad de muestra. El análisis y la interpretación de la prueba se llevaron a cabo según las instrucciones del fabricante. Se observó la densidad óptica y se calculó el ratio S/N (densidad óptica de la muestra / densidad óptica del control negativo * 100). Aquellos sueros con un ratio S/N de 40% o menos eran considerados positivos mientras que aquellos con un ratio S/N entre 40 y 50% considerados dudosos. Aquellos superiores a 50% fueron considerados negativos.

3.3.3. Análisis estadísticos

El análisis estadístico se realizó con el programa IBM SPSS Statistics para Windows (versión 29.0.2.0). Los resultados de los tests serológicos fueron utilizados para estimar la prevalencia (95% de IC) de anticuerpos frente a VIA, VEN y VNO. Para medir el grado de asociación entre distintas variables estudiadas (variación entre poblaciones, categorías taxonómicas, relevancia de

la migración, edad o sexo) se utilizaron dos tests: chi-cuadrado y Fisher ($\alpha = 5\%$). Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando el p-valor fue menor que 0,05 ($p \leq 0,05$). La prueba de Fisher se utilizó cuando se trabajaba con muestras pequeñas (<5) y se esperaban frecuencias bajas, mientras que chi-cuadrado se utilizó en el caso contrario y cuando el análisis realizado mediante Fisher no resultaba debido a la capacidad de procesado del equipo.

4. RESULTADOS

4.1. Seroprevalencia globales por enfermedades

Se obtuvieron las prevalencias totales para cada enfermedad en los tres grupos de estudio, con un IC del 95% [Tabla 2]. En el caso de IA, se observó una mayor prevalencia en aves domésticas respecto a las otras dos poblaciones ($\chi^2(2, N=5852) = 341,991$ y $p < 0,001$). El mismo efecto se observa en las aves domésticas para la EN, ($\chi^2(2, N=12541) = 147,92$ y $p < 0,001$). Sin embargo, para la FNO, sólo se encontraron anticuerpos frente al VNO en la población silvestre, con una prevalencia del 4,8%.

	Silvestres	Domésticas	Centinelas
Influenza Aviar	5,6 (4,4-6,8)	31,6 (20,9 - 42,3)	1,1 (0,8 – 1,4)
Enfermedad de Newcastle	0,9 (0,3 - 1,4)	33,8 (22,5-45,1)	6,5 (6,0 – 6,9)
Fiebre del Nilo Occidental	4,8 (0,1 – 9,5)	0	

Tabla 2. Seroprevalencias globales (%) de las tres enfermedades en las tres poblaciones. Las celdas que no presentan datos se debe a que no se realizaron análisis en ese grupo, porque las hubaras no se vacunan frente al VNO.

En lo relativo a cada localización [Tabla 3], en Missouri se observó una mayor prevalencia de IA en las aves silvestres que en las centinelas ($\chi^2(1, N=3254) = 73,2623$ y $p < 0,001$) mientras que para EN la prevalencia fue en mayor en centinelas ($\chi^2(1, N=6355) = 19,297$ y $p=0,001$), además de ser el único lugar de muestreo con presencia de aves con anticuerpos frente a FNO. Respecto a Enjil, aunque la prevalencia de IA fue similar en aves silvestres y centinelas ($\chi^2(1, N=2525) = 2,2103$ y $p=0,137$), pero la población de centinelas seguía presentando una mayor prevalencia de EN ($\chi^2(1, N=5534) = 0,22,452$ y $p=0,001$). En Bhoukalfa, la prevalencia de IA en las poblaciones doméstica y silvestre fue similar ($\chi^2(1, N=120) = 0,082$ y $p=0,778$), pero la doméstica fue la única que presenta anticuerpos frente al VEN ($\chi^2(1, N=107) = 15,688$ y $p < 0,001$).

	Silvestres			Domésticas			Centinelas		
	IA	EN	FNO	IA	EN	FNO	IA	EN	FNO
Missour	5,3	0,86	8,0	/	/	/	0,7	4,5	/
Enjil	3,3	0,96	0	/	/	/	1,7	8,6	/
Bhoukalfa	34,1	0	0	31,6	33,8	0	/	/	/

Tabla 3. Seroprevalencias (%) de cada enfermedad por población y punto de muestreo. Las celdas que no presentan datos se debe a que: o bien la población no está representada en el punto de muestreo (domésticas en Missour y Enjil, y centinelas en Bhoukalfa) o porque no se realiza vacunación frente a VNO en centinelas.

En base a la representación gráfica de los datos de las prevalencias de anticuerpos frente a AI a lo largo del tiempo [Figura 7], se puede observar que en general que la prevalencia ha sido siempre muy baja hasta 2021, donde se observó un pico notable en las aves silvestres, con una prevalencia del 32,3%. Ese mismo año coincide con el primer año de muestreo de aves domésticas, que alcanzó una prevalencia aún mayor, del 69%, bajando al año siguiente. En cambio, en centinelas se mantuvo estable, con un incremento en 2024.

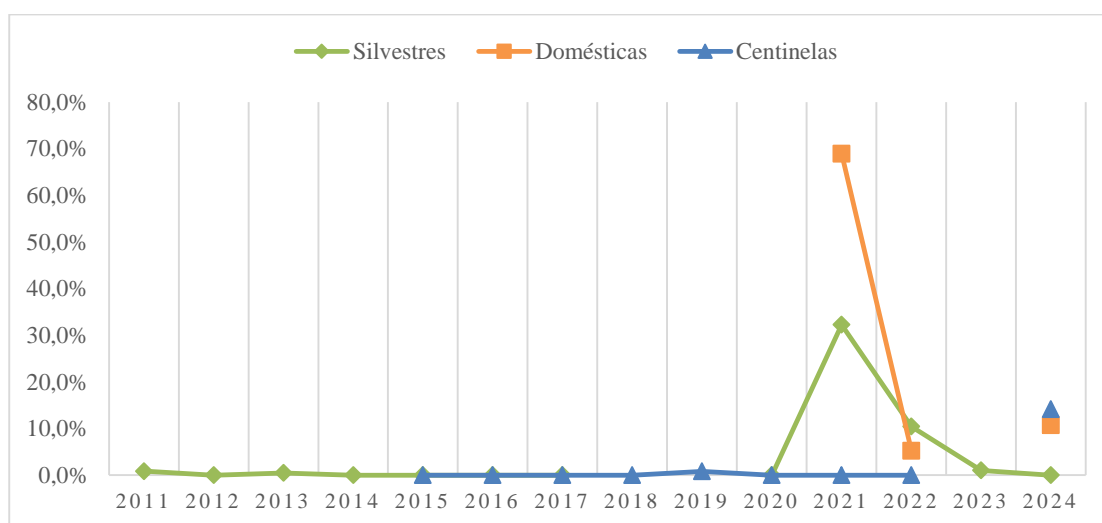


Figura 7. Variación anual en las seroprevalencias de IA en silvestres (◆), domésticos (■) y centinelas (▲).

También se calcularon las tendencias de la EN en las tres poblaciones [Figura 8]. Las aves silvestres mantuvieron una tendencia a la baja, mientras que las centinelas presentaban una prevalencia mayor e irregular, aumentando en los últimos años. Mientras, en aves domésticas, se observó una prevalencia muy alta en 2024, del 71,4%.

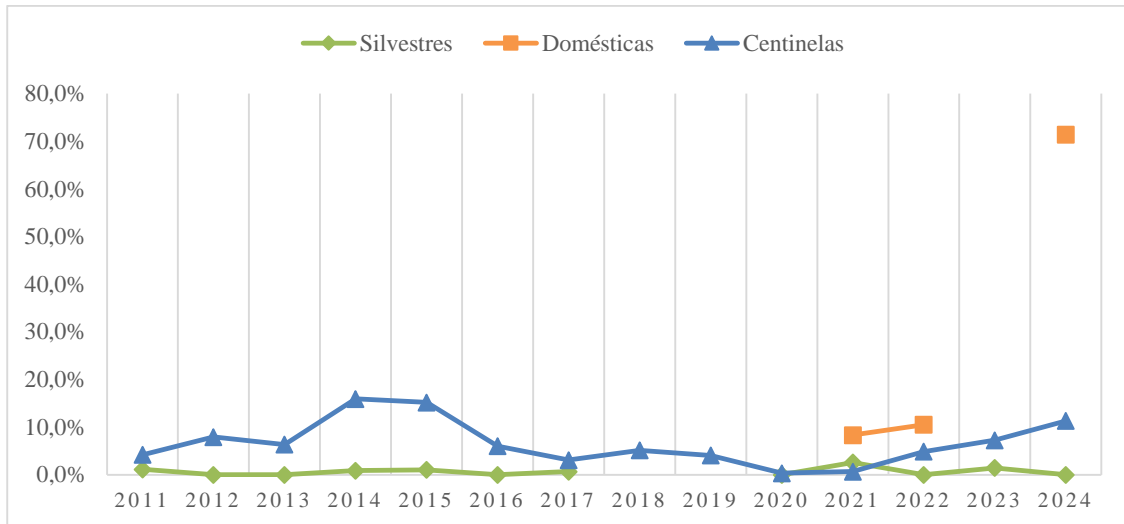


Figura 8. Variación anual en las seroprevalencias de EN en silvestres (◆), domésticos (■) y centinelas (▲).

En el caso de la FNO no se realizó gráfico de tendencias anuales, al no disponer de suficientes datos, ya que en centinelas no se realizan controles y el muestreo en silvestres y domésticos fue pequeño.

4.2. Estudio epidemiológico en aves silvestres

En el estudio de IA en aves silvestres [Figura 9], a lo largo del tiempo el número de aves positivas es muy bajo, salvo en el 2021, donde se aprecia un incremento importante, con un 32,3% de prevalencia, con 61 positivos de 189 muestras.

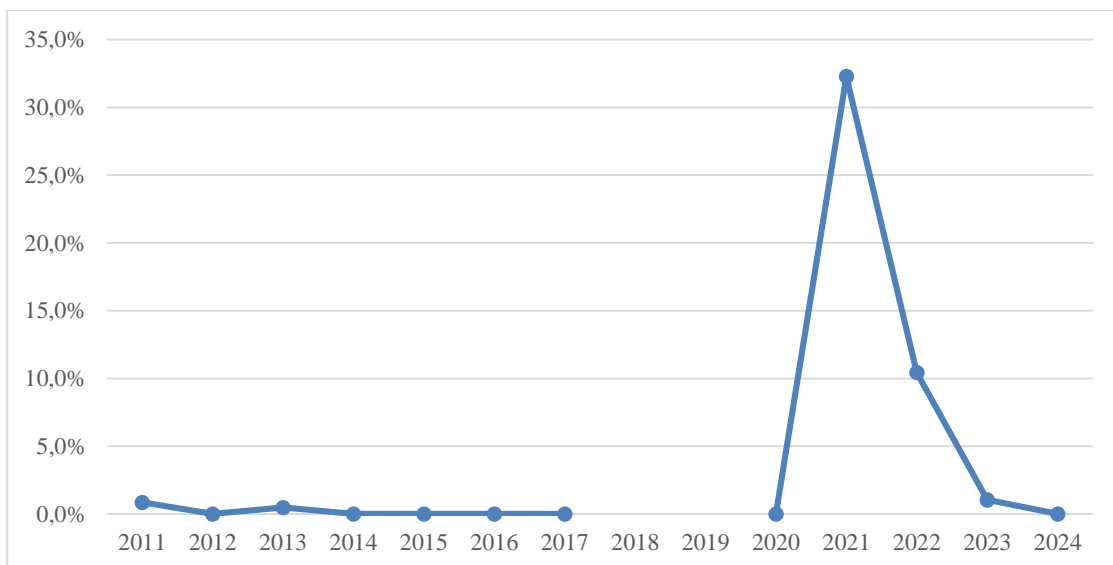


Figura 9. Seropositividad temporal de las muestras analizadas para VIA en silvestres por año.

Se analizó la variación anual de la prevalencia de EN [Figura 10], con pocos positivos a lo largo del tiempo, pero que se presentan de forma esporádica, siendo el año 2021 el de mayor prevalencia, 2,6%.

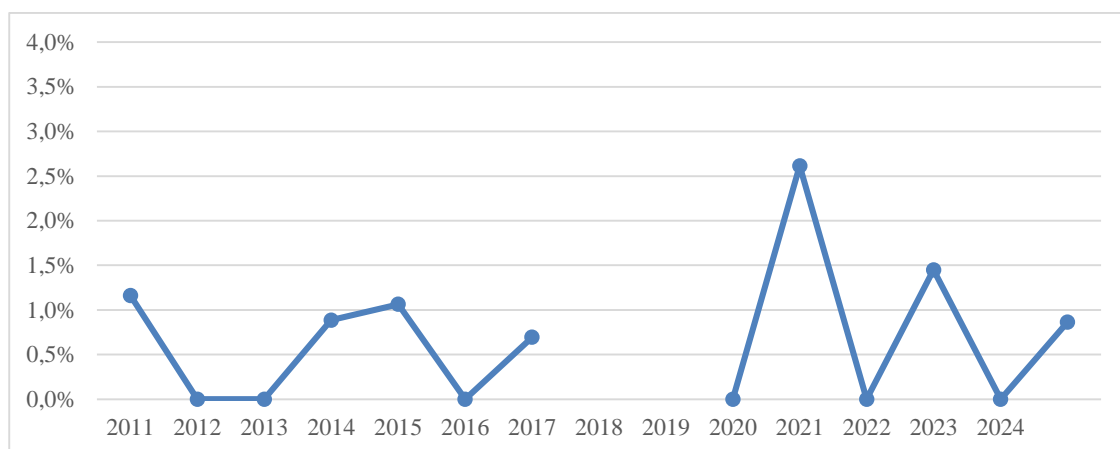


Figura 10. Seropositividad temporal de las muestras analizadas para VEN en silvestres por año.

Al analizar las prevalencias de FNO a lo largo de los años no se observan positivos hasta el año 2020, a partir del cual aparecen 4 positivos, alcanzándose una prevalencia del 66,7% (2/3), aunque hay que tener en cuenta que es debido a que el número de muestras estudiado es pequeño [Figura 11].

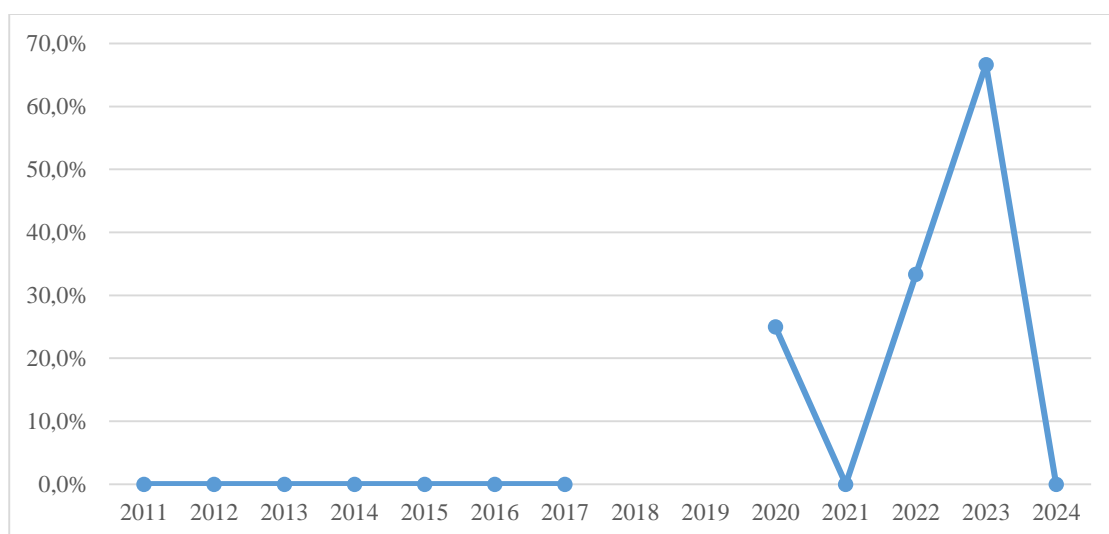


Figura 11. Seropositividad temporal de las muestras analizadas para VNO en silvestres por año.

También destacar que existieron recapturas de 27 ejemplares, todas de la especie *P. domesticus*. Mientras que todos fueron negativos a VEN, dos de ellos resultaron positivos a VIA, negativizando en las pruebas posteriores. En concreto, uno de los dos, fue primero capturado en la aldea Bhoukalfa y recapturado en el ECWP de Missouri tres meses después.

Además de las prevalencias obtenidas para cada enfermedad, también se analizaron distintos factores para tratar de conocer más sobre su circulación y transmisión. Se estudiaron

principalmente el VIA y el VEN, debido a que había más cantidad de datos, al haberse analizado un número mayor que para el VNO.

La población de aves silvestres fue estudiada teniendo en cuenta si realizaban o no migración para ambas enfermedades [Figura 12]. En el caso de la EN no hay diferencias entre ambos grupos ($\chi^2(1, N=1041) = 0,372$ y $p = 0,542$), pero en el caso de IA, las aves migratorias presentan niveles de anticuerpos mayores a las de las aves residentes ($\chi^2(1, N=1362) = 17,011$ y $p < 0,001$).

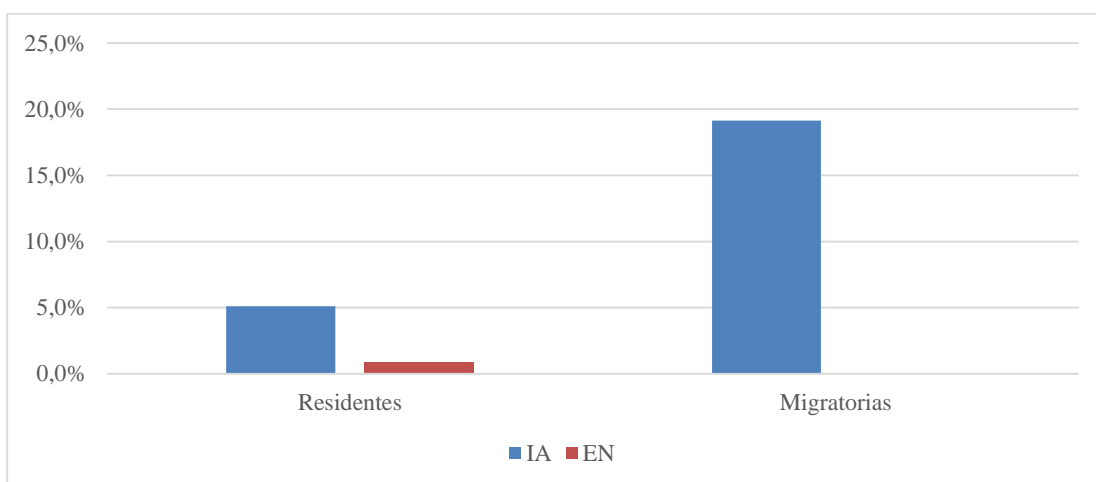


Figura 12. Diferencias en las prevalencias de IA y EN en las aves residentes y migratorias. IA: azul; y EN: rojo.

Dentro de las aves migratorias, se diferenciaron dos épocas importantes: el paso prenupcial, cuando las aves van en dirección norte, a sus lugares de reproducción, y el paso postnupcial, cuando se dirigen a las zonas de invernada al sur [Figura 13]. En el caso del VEN no hubo positivos en estas categorías, pero para VIA sí, aunque no hubo diferencias entre ambos grupos, $\chi^2(1, N=18) = 3,336$ y $p = 0,423$.

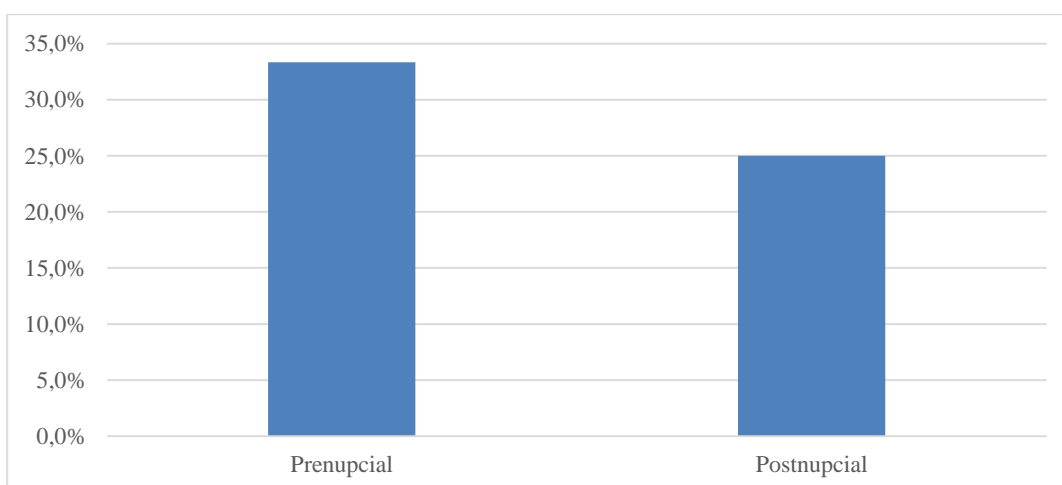


Figura 13. Diferencias en las prevalencias de IA en el paso prenupcial y postnupcial en aves silvestres. IA: azul.

Se estudiaron también las posibles diferencias entre las familias representadas durante el muestreo. De manera general para IA, ($\chi^2(14, N=1438) = 181,239$ y $p < 0,001$), las familias de aves silvestres Acrocephalidae, Alaudidae, Columbidae, Laniidae y Turdidae presentaban tendencia a comportarse como Phasianidae, familia a la que pertenecen todas las aves domésticas, y que se incluyó en el análisis a modo ilustrativo, difiriendo principalmente de Passeridae. En el caso de EN, únicamente Passeridae mostró diferencias con Phasianidae.

Para los cinco órdenes representados. El orden Galliformes, al que pertenecen las aves domésticas, tanto para IA como para EN, y el orden Columbiformes, únicamente para IA, presentaban tendencia a comportarse de igual manera, difiriendo de los passeriformes [Figura 14], (Fisher con un valor de 60,756 y $p < 0,001$ para IA y con un valor de 107,94 y $p < 0,001$ para EN).

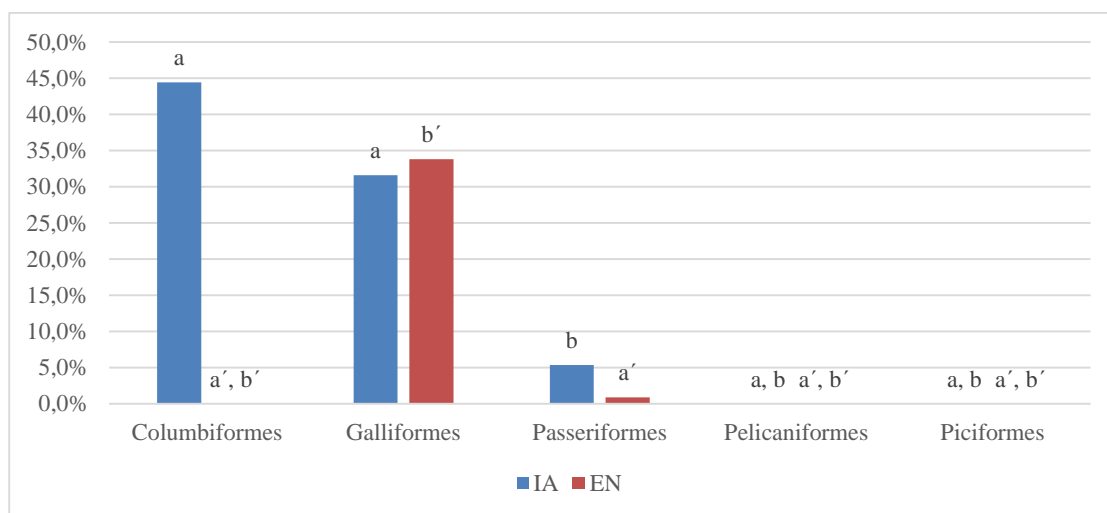


Figura 14. Diferencias en las prevalencias de IA y EN en los distintos órdenes. IA: azul; y EN: rojo.

También se tuvieron en cuenta el sexo y la edad para ambas enfermedades, aunque no se apreciaron significativos al analizarlos para ambas enfermedades. Los resultados fueron: entre VIA y sexo, $\chi^2(1, N=941) = 3.336$ y $p = 1,068$, y entre VIA y edad, $\chi^2(1, N=906) = 0,260$ y $p = 0,610$; mientras que para VEN, respectivamente, $\chi^2(1, N=720) = 0,100$ y $p = 0,752$, y $\chi^2(1, N=704) = 0,032$ y $p = 0,859$.

4.3. Estudio epidemiológico en aves domésticas

Centrándonos en aves domésticas, la escala, a pesar de ser limitada en el tiempo, mostró variaciones temporales. En el caso de la IA [Figura 15], el año 2021 arrojó una alta prevalencia, del 69% (20/29), disminuyendo después y aumentando ligeramente en 2024.

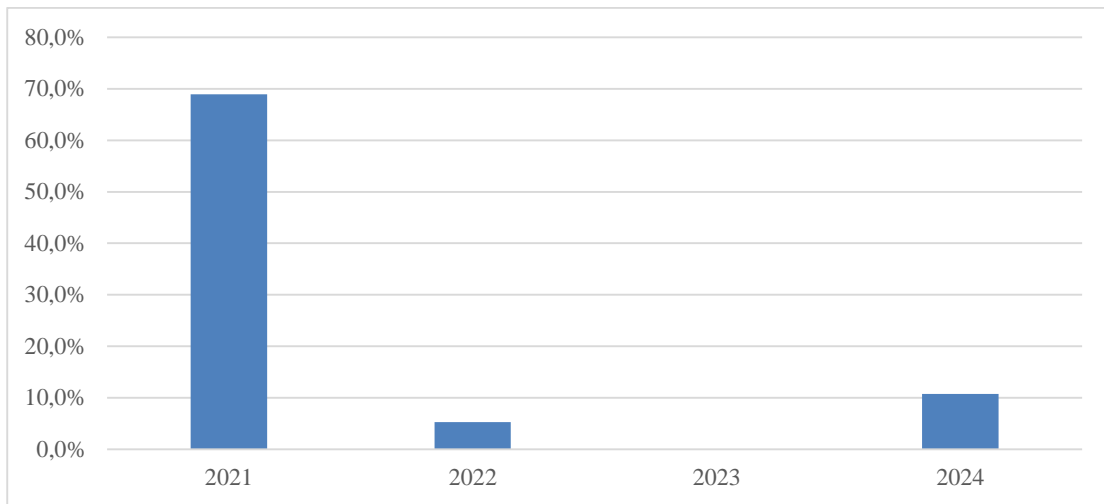


Figura 15. Prevalencias de IA en aves domésticas.

Sin embargo, para EN [Figura 16], la tendencia aumenta progresivamente, con un aumento importante de la presencia de anticuerpos frente a la enfermedad en 2024, un 71,4% (20/28).

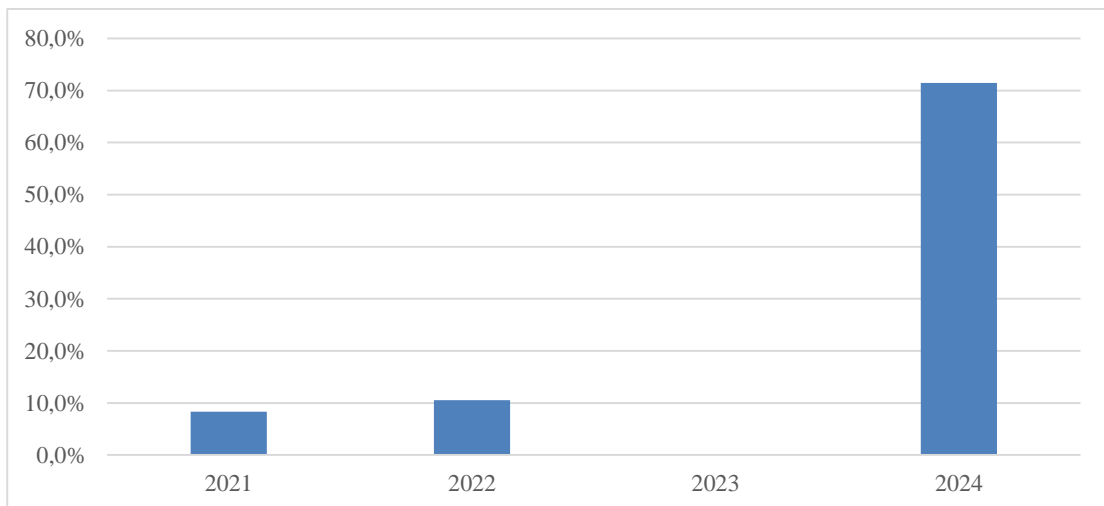


Figura 16. Prevalencias de EN en aves domésticas.

Por último, se analizó una pequeña fracción de muestras para VNO (n=65), con resultado negativo en todas.

4.4. Estudio epidemiológico en aves centinelas

En el estudio de las aves centinelas, en el caso de IA, la prevalencia se mantiene baja durante la mayoría de años [Figura 17], observándose un aumento importante de la prevalencia en 2024, mostrando un 19,6% de la población anticuerpos frente a la enfermedad en el centro de Enjil.

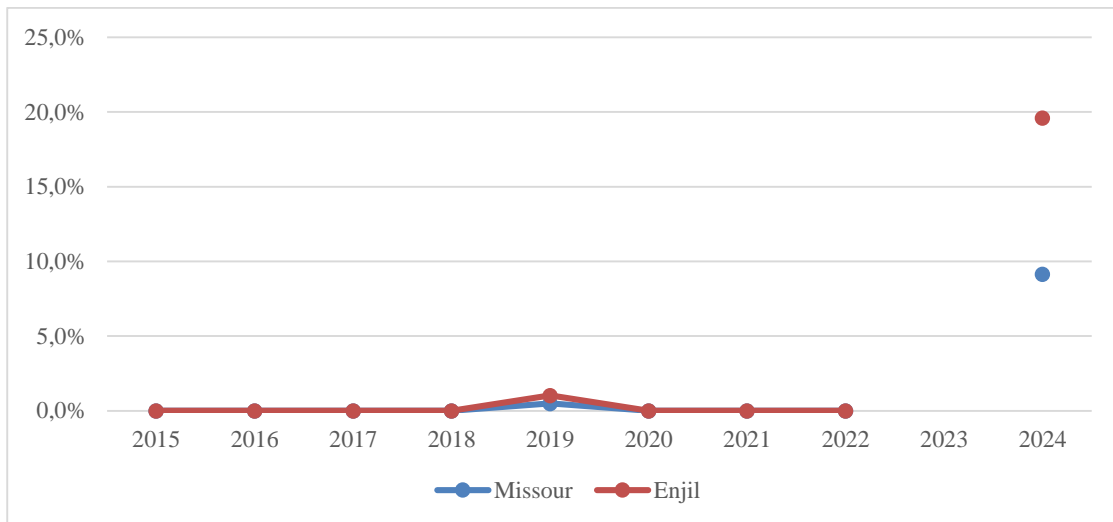


Figura 17. Evolución temporal de IA en Missouri y Enjil. Missouri: Azul; y Enjil: rojo.

En cambio, para la EN [Figura 18], la tendencia es más irregular, con el mayor pico de prevalencia en 2015, con un 36,9% de prevalencia en el centro de Enjil, que disminuye a más de la mitad en los años posteriores. Aunque cabe destacar que a partir del año 2022 hay un aumento de nuevo en el centro de Enjil, volviendo a disminuir en el año 2024.

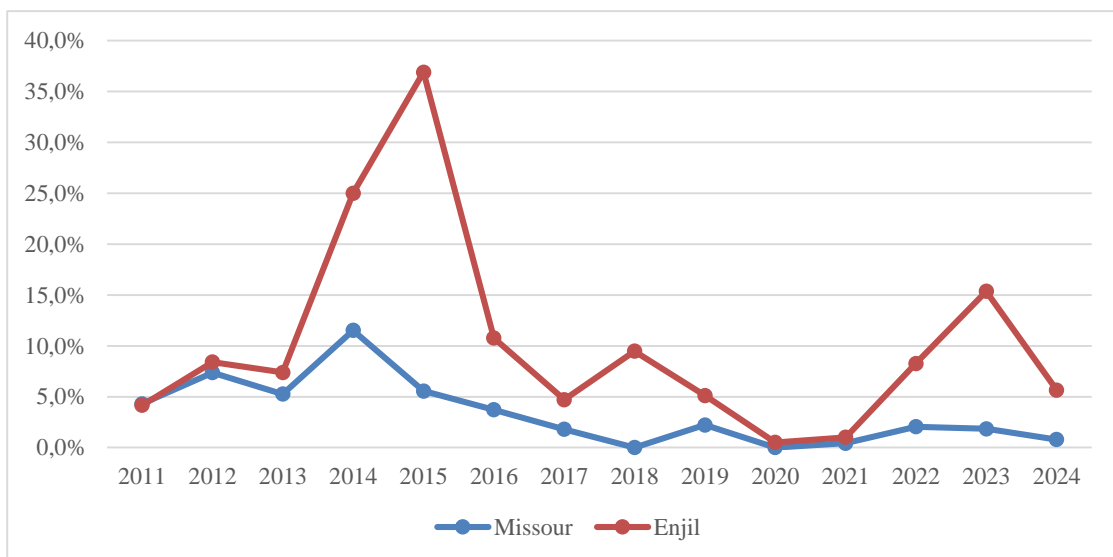


Figura 18. Evolución temporal de EN en Missouri y Enjil. Missouri: Azul; y Enjil: rojo.

5. DISCUSIÓN

En este trabajo, desarrollado en colaboración con Reneco, pretende aportar información sobre la circulación de las principales enfermedades virales con presencia demostrada en territorio próximo a los centros de cría de avutarda hubara africana en Marruecos. En este sentido, se confirmó la circulación de los VIA, VEN y VNO en la población de aves silvestres de los centros

de cría y conservación de la avutarda hubara en Marruecos, lo que podría suponer un riesgo para su conservación, así como la circulación de VIA en el pueblo de Ouled Bhoukalfa.

La seroprevalencia global de obtenida de IA en aves silvestres fue del 5,6%, con un pico en el año 2021, donde alcanzó el 32,3%. Sin embargo, los resultados distan de los obtenidos en otros países, como Egipto (Fadel & Afifi, 2017), Pakistan (Aziz et al., 2023) o Irán (Hadipour et al., 2011), con unas prevalencias del 67,4%, 52,5 y 76%, respectivamente. Esta discrepancia puede ser debida a diferencias geográficas, al tratarse el área de estudio de una zona más aislada. También puede influir que las aves escojan otras rutas, más cercanas a la costa, donde los recursos son más abundantes.

La EN presentó con una seroprevalencia total más baja, del 0,9%, y no alcanzando más del 2,6% en ninguno de los años analizados. De igual modo que la IA, las prevalencias obtenidas difieren de otras zonas, como Nigeria (Inuwa et al., 2023) o Pakistán (Aziz et al., 2023), con prevalencias de 4% y 24,9% en aves silvestres.

Sin embargo, en las aves domésticas del pueblo de Bhoukalfa se detectaron mayores seroprevalencias, con un 31,6 y 33,5% de los ejemplares muestreados mostrando presencia de anticuerpos frente a VIA y VEN respectivamente. Estos resultados, a pesar de ser bajos comparados con lo reportado en Irán (39,0 y 40,1%; Saadat et al., 2014), Pakistán (73,1 y 67; Aziz et al., 2023) y en el propio Marruecos (63,5 y 52,1%; Fagrach et al., 2023) en aves de corral, son mayores que las de las aves silvestres. Aunque cabe destacar que al realizar el análisis de seroprevalencias por separado en los tres puntos de muestreo, en Bhoukalfa las aves silvestres no presentaron anticuerpos frente a EN mientras que sí lo hicieron para IA, con un nivel similar al de las aves domésticas, aunque esto puede ser debido a que el número procedente de silvestres en Bhoukalfa es más pequeño que para los otros dos puntos.

Al analizar más detalladamente las especies silvestres, se comprobó que 5 de las 14 familias representadas en el estudio (Acrocephalidae, Alaudidae, Columbidae, Laniidae y Turdidae) presentaban tendencia a tener mayor prevalencia de IA, como en las aves domésticas, lo que puede ser causado por un menor número de muestras analizadas para estas familias. Mientras que por órdenes, sólo los Columbiformes se comportaban de similar manera a las aves de corral para la IA. Se ha propuesto que las palomas y tórtolas (orden Columbiformes) pueden llegar a actuar como portadores de otros VIA (Fadel & Afifi, 2017). Para el caso de EN, a pesar de no haberse encontrado positivos, sí que se ha reportado una alta mortalidad de estas especies, sobre todo de tórtola turca (*Streptopelia decaocto*) en la zona en 2022 (M. Carrasco, comunicación personal). Esto podría deberse a la circulación de VEN adaptados a palomas, más patógenos para esta especie según lo reportado en Italia y otros países de Europa (Terregino et al., 2003).

Respecto a aves silvestres migratorias y residentes, en este estudio no se encontraron diferencias entre ambos grupos, aunque ampliamente se ha propuesto que estas enfermedades son diseminadas durante la migración (Al-Rasheed, 2024; Gass et al., 2023; Lindh et al., 2008; Olsen et al., 2006; Zanetti et al., 2005), sobre todo en estudios realizados en Anseriformes. Al atravesar diferentes zonas durante su viaje, estas aves pueden entrar en contacto con una mayor variedad de patógenos que las aves que permanecen en el mismo territorio todo el año (Altizer et al., 2011). De este modo las aves migratorias podrían actuar tanto como portadoras de los virus y como amplificadoras de éstos en los lugares de invernada y/o reproducción, donde se concentrarían una mayor variedad de subtipos (Venkatesh et al., 2018; Verhagen et al., 2014).

También se ha reportado que la prevalencia suele ser más alta durante el paso postnupcial (Xu et al., 2016) debido a la presencia de ejemplares juveniles, inmunológicamente inmaduros y más susceptibles a las enfermedades (Blagodatski et al., 2021; Ferro et al., 2010). Aunque en el presente estudio no se han encontrado diferencias tanto para la migración pre y postnupcial como la edad. Para el sexo no se encontraron diferencias, lo cual tampoco se ha reportado (Ferro et al., 2010).

Para las hubaras centinelas la seroprevalencia frente al VIA fue baja durante todos los años. Recientemente, ya se había reportado la infección natural por VIA H9N2 en hubaras en otras colecciones de Marruecos, con una prevalencia del 33% (Bidoudan et al., 2023). Mientras que la del VEN fue más alta, sobre todo hasta el año 2015, aunque esto puede ser debido a la utilización de vacunas vivas hasta ese año, utilizándose posteriormente vacunas inactivadas, lo cual coincide con una caída brusca de la seroprevalencia en centinelas (Dimitrov et al., 2017). La implementación de otras estrategias de vacunación DIVA, como el uso de vacunas marcadoras, permitiría la eliminación de las aves centinelas, pudiendo estar todo el grupo protegido (Suarez, 2005), pero las pruebas serológicas de estas vacunas solo están validadas para aves de producción.

A pesar de ello, en esos años no parece haber transmisión a las aves silvestres, ya que la seroprevalencia se mantiene baja. Además, cuando existió un aumento de la seroprevalencia en la población silvestre (2021), no se reflejó en la de centinelas, y viceversa, por lo que parece que no existe valor predictivo de las variaciones de las prevalencias entre ambas poblaciones.

Aun así, a pesar de que el contacto directo las hubaras con las aves domésticas de corral no es posible debido a la distancia geográfica, la importancia de la circulación de enfermedades en éstas últimas es importante. La posibilidad de que las aves silvestres se infecten a partir del contacto con las aves domésticas, y viceversa, la han planteado numerosos autores (Alexander, 2011; Fagrach et al., 2023; Hassan et al., 2017; Kim et al., 2007), demostrándose también experimentalmente para el caso del VIA H9N2 (Iqbal et al., 2013). De este modo, debido a las condiciones de manejo y sanitarias en las que se encuentran las aves de corral de las zonas rurales

(hacinamiento, escasa higiene, falta de inmunoprofilaxis, convivencia de diferentes especies, tanto aves como mamíferos, etc), las aves silvestres podrían infectarse en los pueblos cercanos a los centros y actuar como puente entre ambas poblaciones (Fadel & Afifi, 2017), ya que el movimiento de aves entre zonas, Missouri-Bhoukalfa, aunque limitado, existe. Esta hipótesis puede verse reforzada con la recaptura de un ejemplar de gorrión común en el centro de Missouri, tras haber sido capturado previamente en la aldea de Bhoukalfa, donde presentaba anticuerpos frente a VIA.

Además, los trabajadores de los centros de cría viven en estas zonas rurales, pudiendo tener aves de corral traspatio, por lo que también pueden introducir los virus al centro si no existiesen las adecuadas medidas de bioseguridad.

Esto se puede ver propiciado por el propio “efecto oasis” que crean los centros (Hirschinger et al., 2020), ya que pueden proveer diferentes recursos (alimento, agua o refugio) tanto a las aves silvestres como a las migratorias, favoreciendo su concentración, así como la posible circulación de patógenos. Sobre todo, en entorno tan áridos como en los que se encuentran los centros, donde el agua es un recurso escaso (Martínez-Guijosa et al., 2021), por lo que una correcta gestión puede reducir la presencia de aves silvestres (ajustar la cantidad de riego, no dejar recipientes con agua al alcance de las aves...).

Por último, respecto a la FNO, solo se detectaron anticuerpos en aves silvestres, con una seroprevalencia total del 4,6 %, y únicamente en el centro de Missouri, donde representó un 8% de las muestras analizadas. Esta seroprevalencia difiere de la obtenida en otros países como Bangladesh (11,9%; Islam et al., 2020) o Malasia (18,7%; Ain-Najwa et al., 2020), aunque resulta más similar a la obtenida en Algeria (7,8%; Medrouh et al., 2020) o la obtenida en otro estudio de Marruecos (3,5%; Figuerola et al., 2009).

En esta enfermedad también las aves silvestres juegan un papel importante, participando tanto en su mantenimiento como en su dispersión durante la migración (Yeh et al., 2011). A pesar de ello hay que tener en cuenta que la prueba utilizada para su detección, ELISA, puede dar reacciones cruzadas con otros *Flavivirus* presentes en el país (Assaid et al., 2021), por lo que sería de interés realizar pruebas más específicas, como pruebas de neutralización de virus, para verificar los resultados obtenidos (Seidowski et al., 2010). De igual manera, sería interesante disponer de más muestras, tanto de aves silvestres como de domésticas, ya que el número estudiado fue pequeño debido a su disponibilidad, por lo que los resultados también pueden no ser representativos.

6. CONCLUSIONES

Este TFG ha permitido constatar la circulación en aves silvestres de tres enfermedades virales (IA, EN y FNO) en centros de cría y conservación de hubara de Marruecos. Por otro lado, también

se detectó la presencia de anticuerpos frente a VIA y VEN en aves de corral en un pueblo cercano a uno de los centros.

Aunque las seroprevalencias obtenidas en silvestres no fueron muy altas, la presencia de estas enfermedades en las aves domésticas puede ser una fuente de infección. Como el contacto entre ambas poblaciones es posible, las aves silvestres podrían actuar como hospedadores puente entre las zonas rurales y los centros de hubaras, lo cual repercutiría negativamente en su conservación. Por ello, resulta de interés seguir monitorizando y estudiando tanto las poblaciones de aves silvestres como de domésticas, para poder detectar cuanto antes las posibles amenazas que pongan en riesgo el proyecto de recuperación de la especie.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Agüero, M., Monne, I., Sánchez, A., Zecchin, B., Fusaro, A., Ruano, M. J., Del Valle Arrojo, M., Fernández-Antonio, R., Souto, A. M., Tordable, P., Cañas, J., Bonfante, F., Giussani, E., Terregino, C., & Orejas, J. J. (2023). Highly pathogenic avian influenza A(H5N1) virus infection in farmed minks, Spain, October 2022. *Eurosurveillance*, 28(3). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2023.28.3.2300001>
- Ain-Najwa, M. Y., Yasmin, A. R., Omar, A. R., Arshad, S. S., Abu, J., Mohammed, H. O., Kumar, K., Loong, S. K., Rovie-Ryan, J. J., & Mohd-Kharip-Shah, A.-K. (2020). Evidence of West Nile virus infection in migratory and resident wild birds in west coast of peninsular Malaysia. *One Health*, 10, 100134. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2020.100134>
- Alexander, D. J. (2011). Newcastle disease in the European Union 2000 to 2009. *Avian Pathology*, 40(6), 547-558. <https://doi.org/10.1080/03079457.2011.618823>
- Al-Rasheed, M. (2024). A Review of Current Knowledge on Avian Newcastle Infection in Commercial Poultry in the Kingdom of Saudi Arabia. *Open Veterinary Journal*, 14((1) (International Zagazig Vet), 12. <https://doi.org/10.5455/OVJ.2024.v14.i1.2>
- Altizer, S., Bartel, R., & Han, B. A. (2011). Animal Migration and Infectious Disease Risk. *Science*, 331(6015), 296-302. <https://doi.org/10.1126/science.1194694>
- Assaid, N., Arich, S., Ezzikouri, S., Benjelloun, S., Dia, M., Faye, O., Akarid, K., Beck, C., Lecollinet, S., Failloux, A.-B., & Sarih, M. (2021). Serological evidence of West Nile virus infection in human populations and domestic birds in the Northwest of Morocco. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 76, 101646. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2021.101646>
- Aziz, U. R., Shabbir, M. A. B., Iqbal, M. Z., Yasin, R., Ishaq, H. M., Mehmood, A., Yousaf, F., Rasheed, M., Rasul, S., Usman, M., & Raza, M. A. (2023). Seroprevalence of Newcastle

disease virus and avian influenza virus in poultry and captive wild birds in poultry-dense regions of Pakistan. *Veterinaria italiana*, 59(1), 1–10. <https://doi.org/10.12834/VetIt.2449.17415.2>

- Benjelloun, A., El Harrak, M., & Belkadi, B. (2016). West Nile Disease Epidemiology in North-West Africa: Bibliographical Review. *Transboundary and Emerging Diseases*, 63(6), e153-e159. <https://doi.org/10.1111/tbed.12341>
- Bidoudan, Y., Mouahid, M., Fassi Fihri, O., Bollo, E., Arbani, O., Ducatez, M., Banni, B., Tligui, N., & Fellahi, S. (2023). First Report of Low Pathogenic Avian Influenza Subtype H9N2 in African Houbara Bustards (*Chlamydotis undulata undulata*) and Gamebirds in Morocco: Clinico-Pathological Findings, Molecular Characterization, and Associated Coinfections. *Viruses*, 15(12), 2374. <https://doi.org/10.3390/v15122374>
- Blagodatski, A., Trutneva, K., Glazova, O., Mityaeva, O., Shevkova, L., Kegeles, E., Onyanov, N., Fede, K., Maznina, A., Khavina, E., Yeo, S.-J., Park, H., & Volchkov, P. (2021). Avian Influenza in Wild Birds and Poultry: Dissemination Pathways, Monitoring Methods, and Virus Ecology. *Pathogens*, 10(5), 630. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050630>
- Boroomand, Z., Mayahi, M., Hosseini, H., & Valadbeigi, S. (2019). Detection and Isolation of H9N2 subtype avian influenza virus in House sparrows (*Passer domesticus*) of Ahvaz, Iran. *Archives of Razi Institute, Online First*. <https://doi.org/10.22092/ari.2019.122504.1223>
- Buckles, E., Ruiz, J., Korich, J., Torres, A., Banda, A., Mondal, S., & Lucio-Martínez, B. (2012). *Atlas of avian diseases*. Cornell University. <https://partnersah.vet.cornell.edu/avian-atlas/#/> Consultado el: 20/07/2024.
- Contreras, A., Gómez-Martín, A., Paterna, A., Tatay-Dualde, J., Prats-Van Der Ham, H. M., Corrales, J. C., De La Fe, F. C., & Sánchez, A. (2016). Papel epidemiológico de las aves en la transmisión y mantenimiento de zoonosis: -EN- Epidemiological role of birds in the transmission and maintenance of zoonoses -FR- Rôle épidémiologique des oiseaux dans la transmission et la persistance des zoonoses -ES-. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 35(3), 845-862. <https://doi.org/10.20506/rst.35.3.2574>
- Díaz, M., Asensio, B., & Tellería, J. L. (1996). *Aves Ibéricas. I. No Paseriformes*. Ed. J.M. Reyero, Madrid.
- Dimitrov, K. M., Afonso, C. L., Yu, Q., & Miller, P. J. (2017). Newcastle disease vaccines—A solved problem or a continuous challenge? *Veterinary Microbiology*, 206, 126-136. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.12.019>

- Fadel, H. M., & Afifi, R. (2017). Investigation of avian influenza infection in wild birds in Ismailia and Damietta cities, Egypt. *Veterinary World*, *10*(6), 695-701. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.695-701>
- Fagrach, A., Arbani, O., Karroute, O., El-Ftouhy, F. Z., Kichou, F., Bouslikhane, M., & Fellahi, S. (2023). Prevalence of major infectious diseases in backyard chickens from rural markets in Morocco. *Veterinary World*, 1897-1906. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2023.1897-1906>
- Ferro, P. J., Budke, C. M., Peterson, M. J., Cox, D., Roltsch, E., Merendino, T., Nelson, M., & Lupiani, B. (2010). Multiyear Surveillance for Avian Influenza Virus in Waterfowl from Wintering Grounds, Texas Coast, USA. *Emerging Infectious Diseases*, *16*(8), 1224-1230. <https://doi.org/10.3201/eid1608.091864>
- Figuerola, J., Baouab, R. E., Soriguer, R., Fassi-Fihri, O., Llorente, F., & Jiménez-Clavero, M. A. (2009). West Nile Virus Antibodies in Wild Birds, Morocco, 2008. *Emerging Infectious Diseases*, *15*(10), 1651-1653. <https://doi.org/10.3201/eid1510.090340>
- Gamarra-Toledo, V., Plaza, P. I., Gutiérrez, R., Inga-Díaz, G., Saravia-Guevara, P., Pereyra-Meza, O., Coronado-Flores, E., Calderón-Cerrón, A., Quiroz-Jiménez, G., Martínez, P., Huamán-Mendoza, D., Nieto-Navarrete, J. C., Ventura, S., & Lambertucci, S. A. (2023). Mass Mortality of Sea Lions Caused by Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Virus. *Emerging Infectious Diseases*, *29*(12). <https://doi.org/10.3201/eid2912.230192>
- Gass, J. D., Dusek, R. J., Hall, J. S., Hallgrímsson, G. T., Halldórsson, H. P., Vignisson, S. R., Ragnarsdóttir, S. B., Jónsson, J. E., Krauss, S., Wong, S., Wan, X., Akter, S., Sreevatsan, S., Trovão, N. S., Nutter, F. B., Runstadler, J. A., & Hill, N. J. (2023). Global dissemination of influenza A virus is driven by wild bird migration through arctic and subarctic zones. *Molecular Ecology*, *32*(1), 198-213. <https://doi.org/10.1111/mec.16738>
- González-Barrio, D. Zoonoses and Wildlife: One Health Approach. *Animals* 2022, *12*, 480. <https://doi.org/10.3390/ani12040480>
- Guerra, P., Fernie, K., Jiménez, B., Pacepavicius, G., Shen, L., Reiner, E., Eljarrat, E., Barceló, D., & Alae, M. (2011). Dechlorane Plus and Related Compounds in Peregrine Falcon (*Falco peregrinus*) Eggs from Canada and Spain. *Environmental Science & Technology*, *45*(4), 1284-1290. <https://doi.org/10.1021/es103333j>
- Gurney, K. E., Williams, T. D., Smits, J. E., Wayland, M., Trudeau, S., & Bendell-Young, L. I. (2005). Impact of oil-sands based wetlands on the growth of mallard (*Anas platyrhynchos*) ducklings. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *24*(2), 457-463. <https://doi.org/10.1897/03-575.1>

- Gutiérrez, R. A., Sorn, S., Nicholls, J. M., & Buchy, P. (2011). Eurasian Tree Sparrows, Risk for H5N1 Virus Spread and Human Contamination through Buddhist Ritual: An Experimental Approach. *PLoS ONE*, 6(12), e28609. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028609>
- Hadipour, M. M., Vosoughi, A., Fakhrabadipour, M., Azad, F., & Khademi, I. (2011). Serological evaluation for supporting the potential role of house sparrows in LPAIV (H9N2) transmission. *International Journal of Animal and Veterinary Advances*, 3(3), 189-192.
- Hassan, M. M., Hoque, Md. A., Debnath, N. C., Yamage, M., & Klaassen, M. (2017). Are Poultry or Wild Birds the Main Reservoirs for Avian Influenza in Bangladesh? *EcoHealth*, 14(3), 490-500. <https://doi.org/10.1007/s10393-017-1257-6>
- Hirschinger, J., Munoz, M. C., Hingrat, Y., Vergne, T., Guerin, J. L., & Le Loc'h, G. (2020). Exposure to and Circulation of Avian Influenza and Newcastle Disease Viruses in Peridomestic Wild Birds in the United Arab Emirates. *Journal of wildlife diseases*, 56(2), 437-442.
- Inuwa, B., Yiltawe, W., Shuaib Adamu, G., Oyekan, O., Osemeke Onyeka, H., Ochuko, O., Gulak Hussaini, U., Ismailia, S., & Meseko, C. (2023). Serological evidence of Newcastle disease virus antibodies in wild birds in Zaria, Kaduna State, Nigeria. *Veterinaria italiana*, 59(2), 10.12834/VetIt.2710.17457.2. <https://doi.org/10.12834/VetIt.2710.17457.2>
- Iqbal, M., Yaqub, T., Mukhtar, N., Shabbir, M. Z., & McCauley, J. W. (2013). Infectivity and transmissibility of H9N2 avian influenza virus in chickens and wild terrestrial birds. *Veterinary Research*, 44(1), 100. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-100>
- Islam, A., Islam, S., Hossain, M. E., Ferdous, J., Abedin, J., Ziaur Rahman, M., Rahman, Md. K., Hoque, Md. A., & Hassan, M. M. (2020). Serological Evidence of West Nile Virus in Wild Birds in Bangladesh. *Veterinary Sciences*, 7(4), 164. <https://doi.org/10.3390/vetsci7040164>
- Jørgensen, P. H., Handberg, K. J., Ahrens, P., Therkildsen, O. R., Manvell, R. J., & Alexander, D. J. (2004). Strains of avian paramyxovirus type 1 of low pathogenicity for chickens isolated from poultry and wild birds in Denmark. *Veterinary Record*, 154(16), 497-500. <https://doi.org/10.1136/vr.154.16.497>
- Kalonda, A., Saasa, N., Kajihara, M., Nao, N., Moonga, L., Ndebe, J., Mori-Kajihara, A., Mukubesa, A. N., Sakoda, Y., Sawa, H., Takada, A., & Simulundu, E. (2024). Phylogenetic Analysis of Newcastle Disease Virus Isolated from Poultry in Live Bird Markets and Wild Waterfowl in Zambia. *Microorganisms*, 12(2), 354. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12020354>

- Kappes, A., Tozoooneyi, T., Shakil, G., Railey, A. F., McIntyre, K. M., Mayberry, D. E., Rushton, J., Pendell, D. L., & Marsh, T. L. (2023). Livestock health and disease economics: A scoping review of selected literature. *Frontiers in Veterinary Science*, *10*, 1168649. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1168649>
- Kim, L. M., King, D. J., Curry, P. E., Suarez, D. L., Swayne, D. E., Stallknecht, D. E., Slemons, R. D., Pedersen, J. C., Senne, D. A., Winker, K., & Afonso, C. L. (2007). Phylogenetic Diversity among Low-Virulence Newcastle Disease Viruses from Waterfowl and Shorebirds and Comparison of Genotype Distributions to Those of Poultry-Origin Isolates. *Journal of Virology*, *81*(22), 12641-12653. <https://doi.org/10.1128/JVI.00843-07>
- Lair, S., Quesnel, L., Signore, A. V., Delnatte, P., Embury-Hyatt, C., Nadeau, M.-S., Lung, O., Ferrell, S. T., Michaud, R., & Berhane, Y. (2024). Outbreak of Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Virus in Seals, St. Lawrence Estuary, Quebec, Canada1. *Emerging Infectious Diseases*, *30*(6). <https://doi.org/10.3201/eid3006.231033>
- Lindh, E., Huovilainen, A., Rätti, O., Ek-Kommonen, C., Sironen, T., Huhtamo, E., Pöysä, H., Vaheri, A., & Vapalahti, O. (2008). Orthomyxo-, paramyxo- and flavivirus infections in wild waterfowl in Finland. *Virology Journal*, *5*(1), 35. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-5-35>
- Llorente, F., García-Irazábal, A., Pérez-Ramírez, E., Cano-Gómez, C., Sarasa, M., Vázquez, A., & Jiménez-Clavero, M. Á. (2019). Influence of flavivirus co-circulation in serological diagnostics and surveillance: A model of study using West Nile, Usutu and Bagaza viruses. *Transboundary and Emerging Diseases*, *66*(5), 2100-2106. <https://doi.org/10.1111/tbed.13262>
- Ma, W., Lager, K. M., Vincent, A. L., Janke, B. H., Gramer, M. R., & Richt, J. A. (2009). The Role of Swine in the Generation of Novel Influenza Viruses. *Zoonoses and Public Health*, *56*(6-7), 326-337. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01217.x>
- Martínez-de La Puente, J., Ferraguti, M., Ruiz, S., Roiz, D., Llorente, F., Pérez-Ramírez, E., Jiménez-Clavero, M. Á., Soriguer, R., & Figuerola, J. (2018). Mosquito community influences West Nile virus seroprevalence in wild birds: Implications for the risk of spillover into human populations. *Scientific Reports*, *8*(1), 2599. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20825-z>
- Martínez-Guijosa, J., Lima-Barbero, J. F., Acevedo, P., Cano-Terriza, D., Jiménez-Ruiz, S., Barasona, J. Á., Boadella, M., García-Bocanegra, I., Gortázar, C., & Vicente, J. (2021). Description and implementation of an On-farm Wildlife Risk Mitigation Protocol at the wildlife-livestock interface: Tuberculosis in Mediterranean environments. *Preventive Veterinary Medicine*, *191*, 105346. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105346>

- Martín-Maldonado, B., Rodríguez-Alcázar, P., Fernández-Novo, A., González, F., Pastor, N., López, I., Suárez, L., Moraleda, V., & Aranaz, A. (2022). Urban Birds as Antimicrobial Resistance Sentinels: White Storks Showed Higher Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Levels Than Seagulls in Central Spain. *Animals*, 12(19), 2714. <https://doi.org/10.3390/ani12192714>
- Mazzamuto, M. V., Schilling, A. K., & Romeo, C. (2022). Wildlife Disease Monitoring: Methods and Perspectives. *Animals : an open access journal from MDPI*, 12(21), 3032. <https://doi.org/10.3390/ani12213032>
- Medrouh, B., Lafri, I., Beck, C., Leulmi, H., Akkou, M., Abbad, L., Lafri, M., Bitam, I., & Lecollinet, S. (2020). First serological evidence of West Nile virus infection in wild birds in Northern Algeria. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 69, 101415. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101415>
- Ministère de l'Intérieur & Ministère de l'Habitat (2013). *Etude du schéma régional d'aménagement du territoire de la région de Fès Boulemane. Phase I: Diagnostic territorial stratégique. Etape 1: Rapports sectoriels*. Uram Intl. <http://www.srat-rfb.info/documents/MILIEU%20PHYSIQUE%20RESSOURCES%20ET%20ENVIRONNEMENT.pdf?PHPSESSID=51266d699fc656719e963a5fe2bab51a>. Consultado el: 01/07/2024.
- Mörner, T., Obendorf, D. L., Artois, M., & Woodford, M. H. (2002). Surveillance and monitoring of wildlife diseases. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 21(1), 67–76. <https://doi.org/10.20506/rst.21.1.1321>
- Napp, S., Llorente, F., Beck, C., Jose-Cunilleras, E., Soler, M., Pailler-García, L., Amaral, R., Aguilera-Sepúlveda, P., Pifarré, M., Molina-López, R., Obón, E., Nicolás, O., Lecollinet, S., Jiménez-Clavero, M. Á., & Busquets, N. (2021). Widespread Circulation of Flaviviruses in Horses and Birds in Northeastern Spain (Catalonia) between 2010 and 2019. *Viruses*, 13(12), 2404. <https://doi.org/10.3390/v13122404>
- Nemeth, N. M., Thomas, N. O., Orahod, D. S., Anderson, T. D., & Oesterle, P. T. (2010). Shedding and serologic responses following primary and secondary inoculation of house sparrows (*Passer domesticus*) and European starlings (*Sturnus vulgaris*) with low-pathogenicity avian influenza virus. *Avian Pathology*, 39(5), 411-418. <https://doi.org/10.1080/03079457.2010.513043>
- Olsen, B., Munster, V. J., Wallensten, A., Waldenström, J., Osterhaus, A. D. M. E., & Fouchier, R. A. M. (2006). Global Patterns of Influenza A Virus in Wild Birds. *Science*, 312(5772), 384-388. <https://doi.org/10.1126/science.1122438>

- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2021a). Capítulo 3.3.4. Influenza aviar (incluida la infección por los virus de la influenza aviar altamente patógenos). *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres*.
- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2021b). Capítulo 3.3.14. Enfermedad de Newcastle (infección por el virus de la enfermedad de Newcastle). *Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres*.
- Organización Mundial de Sanidad Animal. (2023). Capítulo 1.3. Enfermedades, infecciones e infestaciones de la lista de la OMSA. *Código Sanitario para los Animales Terrestres*
- Pattison, M., McMullin, P., Bradbury, J. M., & Alexander, D. (2008). *Poultry diseases* (6th ed). Elsevier/Butterworth-Heinemann.
- Pérez-Ramírez, E., Llorente, F., & Jiménez-Clavero, M. (2014). Experimental Infections of Wild Birds with West Nile Virus. *Viruses*, *6*(2), 752-781. <https://doi.org/10.3390/v6020752>
- Rappole, J. H., & Hubálek, Z. (2003). Migratory birds and West Nile virus: MIGRATORY BIRDS AND WEST NILE VIRUS. *Journal of Applied Microbiology*, *94*, 47-58. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.94.s1.6.x>
- Reed, K. D., Meece, J. K., Henkel, J. S., & Shukla, S. K. (2003). Birds, Migration and Emerging Zoonoses: West Nile Virus, Lyme Disease, Influenza A and Enteropathogens. *Clinical Medicine & Research*, *1*(1), 5-12. <https://doi.org/10.3121/cm.1.1.5>
- Saadat, Y., Ghafouri, S. A., Tehrani, F., & Langeroudi, A. G. (2014). An active serological survey of antibodies to newcastle disease and avian influenza (H9N2) viruses in the unvaccinated backyard poultry in Bushehr province, Iran, 2012–2013. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, *4*, S213-S216. <https://doi.org/10.12980/APJTB.4.2014C1293>
- Sarker, R. D., Giasuddin, M., Chowdhury, E. H., & Islam, M. R. (2017). Serological and virological surveillance of avian influenza virus in domestic ducks of the north-east region of Bangladesh. *BMC Veterinary Research*, *13*(1), 180. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1104-6>
- Seidowski, D., Ziegler, U., Von Rönn, J. A. C., Müller, K., Hüppop, K., Müller, T., Freuling, C., Mühle, R.-U., Nowotny, N., Ulrich, R. G., Niedrig, M., & Groschup, M. H. (2010). West Nile Virus Monitoring of Migratory and Resident Birds in Germany. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, *10*(7), 639-647. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0236>
- Sikht, F.-Z., Ducatez, M., Touzani, C. D., Rubrum, A., Webby, R., El Houadfi, M., Tligui, N.-S., Camus, C., & Fellahi, S. (2022). Avian Influenza a H9N2 Viruses in Morocco, 2018–2019. *Viruses*, *14*(3), 529. <https://doi.org/10.3390/v14030529>

- Smits, J. E. G., Bortolotti, G. R., Baos, R., Blas, J., Hiraldo, F., & Xie, Q. (2005). Skeletal Pathology in White Storks (*Ciconia ciconia*) Associated With Heavy Metal Contamination in Southwestern Spain. *Toxicologic Pathology*, 33(4), 441-448. <https://doi.org/10.1080/01926230590953097>
- Snoeck, C. J., Marinelli, M., Charpentier, E., Sausy, A., Conzemius, T., Losch, S., & Muller, C. P. (2013). Characterization of newcastle disease viruses in wild and domestic birds in Luxembourg from 2006 to 2008. *Applied and environmental microbiology*, 79(2), 639–645. <https://doi.org/10.1128/AEM.02437-12>
- Somveille, M., Manica, A., Butchart, S. H. M., & Rodrigues, A. S. L. (2013). Mapping Global Diversity Patterns for Migratory Birds. *PLoS ONE*, 8(8), e70907. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070907>
- Suarez, D. L. (2005). Overview of avian influenza DIVA test strategies. *Biologicals*, 33(4), 221-226. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2005.08.003>
- Tellería, J. L., Asensio, B., & Díaz, M. (1999). *Aves Ibéricas. II. Paseriformes*. Ed. J.M. Reyero, Madrid.
- Terregino, C., Cattoli, G., Grossele, B., Bertoli, E., Tisato, E., & Capua, I. (2003). Characterization of Newcastle disease virus isolates obtained from Eurasian collared doves (*Streptopelia decaocto*) in Italy. *Avian Pathology*, 32(1), 63-68. <https://doi.org/10.1080/0307945021000070732>
- Tilli, G., Laconi, A., Galuppo, F., Mughini-Gras, L., & Piccirillo, A. (2022). Assessing Biosecurity Compliance in Poultry Farms: A Survey in a Densely Populated Poultry Area in North East Italy. *Animals*, 12(11), 1409. <https://doi.org/10.3390/ani12111409>
- Venkatesh, D., Poen, M. J., Bestebroer, T. M., Scheuer, R. D., Vuong, O., Chkhaidze, M., Machabishvili, A., Mamuchadze, J., Ninua, L., Fedorova, N. B., Halpin, R. A., Lin, X., Ransier, A., Stockwell, T. B., Wentworth, D. E., Kriti, D., Dutta, J., Van Bakel, H., Puranik, A., ... Lewis, N. S. (2018). Avian Influenza Viruses in Wild Birds: Virus Evolution in a Multihost Ecosystem. *Journal of Virology*, 92(15), e00433-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00433-18>
- Verhagen, J. H., Herfst, S., & Fouchier, R. A. M. (2015). How a virus travels the world. *Science*, 347(6222), 616-617. <https://doi.org/10.1126/science.aaa6724>
- Verhagen, J. H., Van Dijk, J. G. B., Vuong, O., Bestebroer, T., Lexmond, P., Klaassen, M., & Fouchier, R. A. M. (2014). Migratory Birds Reinforce Local Circulation of Avian Influenza Viruses. *PLoS ONE*, 9(11), e112366. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112366>

- Wehmann, E., Herczeg, J., Tanyi, J., Nagy, É., & Lomniczi, B. (1999). Lentogenic field isolates of Newcastle disease virus isolated in Canada and Hungary are identical with the vaccine type used in the region. *Avian Pathology*, 28(1), 6-12. <https://doi.org/10.1080/03079459994984>
- Weissenböck, H., Hubálek, Z., Bakonyi, T., & Nowotny, N. (2010). Zoonotic mosquito-borne flaviviruses: Worldwide presence of agents with proven pathogenicity and potential candidates of future emerging diseases. *Veterinary Microbiology*, 140(3-4), 271-280. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.08.025>
- Wiethoelter, A. K., Beltrán-Alcrudo, D., Kock, R., & Mor, S. M. (2015). Global trends in infectious diseases at the wildlife–livestock interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(31), 9662-9667. <https://doi.org/10.1073/pnas.1422741112>
- Wille, M., & Holmes, E. C. (2020). Wild birds as reservoirs for diverse and abundant gamma- and deltacoronaviruses. *FEMS Microbiology Reviews*, 44(5), 631-644. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa026>
- Xu, Y., Gong, P., Wielstra, B., & Si, Y. (2016). Southward autumn migration of waterfowl facilitates cross-continental transmission of the highly pathogenic avian influenza H5N1 virus. *Scientific Reports*, 6(1), 30262. <https://doi.org/10.1038/srep30262>
- Yeh, J.-Y., Park, J.-Y., & Ostlund, E. N. (2011). Serologic evidence of West Nile Virus in wild ducks captured in major inland resting sites for migratory waterfowl in South Korea. *Veterinary Microbiology*, 154(1-2), 96-103. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.06.030>
- Yildirim, Y., Yilmaz, V., Yazici, K., Ozic, C., & Ozkul, A. (2018). Molecular and serological investigation of West Nile virus (WNV) infection in donkeys, horses and native geese in Turkey. *Revue Méd. Vét.*, 169(4-6), 87-92.
- Zanetti, F., Berinstein, A., Pereda, A., Taboga, O., & Carrillo, E. (2005). Molecular Characterization and Phylogenetic Analysis of Newcastle Disease Virus Isolates from Healthy Wild Birds. *Avian Diseases*, 49(4), 546-550. <https://doi.org/10.1637/7381-051605R.1>
- Zhu, W., Dong, J., Xie, Z., Liu, Q., & Khan, M. I. (2010). Phylogenetic and pathogenic analysis of Newcastle disease virus isolated from house sparrow (*Passer domesticus*) living around poultry farm in southern China. *Virus Genes*, 40(2), 231-235. <https://doi.org/10.1007/s11262-009-0436-0>