



MEMÒRIA DEL PROJECTE

TÍTOL: Estudi de la presència de diclofenac i d'altres fàrmacs antiinflamatoris en mostres sanguínies de voltor comú (*Gyps fulvus*)

PLA I PROGRAMA

El 2011 va començar un projecte d'anellament i marcatge alar de voltors (*Gyps fulvus*) per part del Grup d'Anellament de Calldetenes-Osona (GACO), per tal d'estudiar les migracions i identificar els recents comportaments problemàtics de la població. Aquest estudi que proposem es farà a partir de les mostres de sang que s'obtinguin d'aquests animals capturats.

Els objectius són, en primer lloc, determinar la presència de diclofenac i d'altres fàrmacs a la sang en voltor comú. Per aquest estudi, s'utilitzaran les mostres que s'obtindran a partir del animals que es capturin a l'abocador d'Orís (Osona), on anualment es capturen entre 500 i 800 voltors. El nombre de voltors a mostrejar s'estima entre 70 i 100 individus. L'estudi serà complementari amb el projecte "Diclofenac i d'altres fàrmacs antiinflamatoris en les aus carronyaires de la Península Ibèrica", concedit per la fundació nord-americana "Morris Animal Foundation". En aquest projecte, es realitza una investigació d'aquests fàrmacs en aus carronyaires mortes, a partir de mostres d'òrgans dels animals que arriben morts o moren als centres de recuperació de fauna salvatge d'Espanya i Portugal.

Un segon objectiu serà la determinació de l'estat sanitari dels voltors mitjançant la realització d'un perfil sanguini bàsic (hemograma i bioquímica sanguínia), ja que aquest paràmetres són uns bons indicadors no només del seu estat general sinó també de l'adaptació dels animals al medi.



JUSTIFICACIÓ CIENTÍFICA DEL PROJECTE

Les aus carronyaires són un conjunt d'espècies protegides que en els darrers anys ha augmentat la seva importància pel que s'anomena els "serveis ecosistèmics" que proporcionen, mitjançant l'eliminació de cadàvers d'animals i els seus subproductes del medi natural (Moleón et al., 2014). Recentment, les poblacions d'aus carronyaires, i en concret dels grans voltors, es troben en declivi a la major part de la seva àrea de distribució mundial. No obstant això, a la Península Ibèrica la major part d'aquestes espècies es troben amb una tendència a l'augment o estabilitat de les seves poblacions. Així, Espanya compta amb el 95% de la població de volor comú d'Europa (unes 24.000 parelles), amb el 95% de la població de volor negre (*Aegypius monachus*) (unes 1.300 parelles), el 50% de la població de trençalòs (*Gypaetus barbatus*) (unes 100 parelles) i el 30% de la població d'aufrany (*Neophron percnopterus*) (unes 1.400 parelles). Malgrat aquest bon estat de conservació de les nostres aus carronyaires, l'augment de certes activitats humanes, com els enverinaments, canvis en els hàbitats i polítiques sanitàries, representen un seguit d'amenaques que poden afectar negativament a les nostres poblacions.

Més recentment, l'ús de productes farmacèutics veterinaris ha sigut la causa del col·lapse de les poblacions al subcontinent indi, en concret degut a l'ús veterinari de diclofenac, un fàrmac antiinflamatori no esteroide (Margalida et al., 2010; Oaks et al., 2004). L'any 2013, la comunitat conservacionista i científica va quedar consternada al produir-se la concessió de llicència del diclofenac per a ús veterinari en alguns països europeus, entre ells Espanya. Aquesta situació suposa un gravíssim risc per a la conservació de les aus carronyaires, especialment per a la Península Ibèrica, on habiten grans poblacions de voltors (Balmford, 2013; Camiña et al., 2014; Cressey, 2014; Gilbert, 2014; Margalida et al., 2014; Agència Espanyola del Medicamentos y Productos Sanitarios, 2015). Les aus carronyaires, i especialment algunes espècies de voltors del Gènere *Gyps*, són extremadament sensibles als efectes tòxics de fàrmacs antiinflamatoris no esteroïdals, com el diclofenac, que poden ingerir accidentalment a partir dels cadàvers del bestiar domèstic tractat amb aquests productes. Com s'ha comentat anteriorment, en els anys 90, el diclofenac va causar una mortalitat catastròfica en les poblacions de voltors del



subcontinent indi a causa del consum dels cadàvers del bestiar tractat amb aquest medicament. S'ha calculat que amb tan sols un 0.8% de les canals de bestiar amb residus de diclofenac ja es podria haver causat aquesta mortalitat massiva, estimada en més de 40 milions de voltors morts, el que representa al voltant del 99% de la població, amenaçant d'extinció a diverses espècies. Els governs de l'Índia, el Pakistan i el Nepal van prohibir l'ús veterinari de diclofenac en 2006 i Bangladesh va fer el mateix en 2010. Més recentment, l'Iran ha prohibit oficialment l'exportació, la importació, la producció i l'ús veterinari del diclofenac al país. Aquestes mesures de mitigació han demostrat ser útils per revertir els descensos dramàtics de les poblacions d'aus rapinyaires en el subcontinent indi (Prakash et al., 2012; Chaudry et al., 2012; Cuthbert et al., 2014).

Arnold et al. (2014) van revisar les dades existents sobre l'exposició potencial de la fauna i els ecosistemes a diversos fàrmacs i van concloure que es requereix una investigació més detallada i avaluacions de riscos. Els medicaments veterinaris poden ser alliberats en el medi ambient tant directament com indirectament a través de la depredació o l'eliminació dels animals medicats, i es van coneixent nous casos de possibles intoxicacions amb diferents tipus de medicaments, entre ells altres fàrmacs antiinflamatoris no esteroides com el flunixin (Zorrilla et al., 2015).

L'hematologia i la bioquímica sanguínia són unes de les tècniques de diagnòstic més útils en medicina aviar, són un bon indicador de l'estat general de l'au i de l'adaptació d'aquesta al medi. Tenen tant interès clínic per a veterinaris com a per a estudis de poblacions, ja que ajuden a monitoritzar l'estat sanitari de les poblacions (Giambelluca et al., 2017).

Bibliografia:

AGENCIA ESPAÑOLA DE MEDICAMENTOS Y PRODUCTOS SANITARIOS. 2015. Precauciones sobre la prescripción y administración de los medicamentos veterinarios que contienen diclofenaco autorizados en España. http://www.aemps.gob.es/informa/notasInformativas/medicamentosVeterinarios/2015/docs/Ni-MVET_08-2015-prescripcion_diclofenaco.pdf.



Arnold, K., A. Brown, G. T. Ankley, J. P. Shumpster. 2014. Medicating the environment: assessing risks of pharmaceuticals to wildlife and ecosystems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences* 369: 20130569.

Balmford, A. 2013. Ecology. Pollution, politics, and vultures. *Science (New York, N.Y.)* 339: 653–654.

Camiña, A., J. R. Garrido, J. Martin, C. H. López-Hernández, R. Alfaro. 2014. A new threat to European vultures. *Science (New York, N.Y.)* 344: 150.

Chaudry, M. J. I., D. L. Ogada, R. N. Malik, M. Z. Virani, M. D. Giovanni. 2012. First evidence that populations of the critically endangered Long-billed Vulture *Gyps indicus* in Pakistan have increased following the ban of the toxic veterinary drug diclofenac in south. *Bird Conservation International* 22: 389–397.

Cressey, D. 2014. Poisoned vulture could herald European bird crisis. *Nature*, <http://www.nature.com/news/poisoned-vulture-could-herald-european-bird-crisis-1.16161>.

Cuthbert, R. J., M. A. Taggart, V. Prakash, S. S. Chakraborty, P. Deori, T. Galligan, M. Kulkarni, S. Ranade, M. Saini, A. K. Sharma, R. Shringarpure, R. E. Green. 2014. Avian scavengers and the threat from veterinary pharmaceuticals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences* 369: 20130574.

Giambelluca S, Cammarata M, Dara S, Orefice T, Camiña-Cardenal A, Vazzana I. 2017. The impact of captivity on some haematological parameters of griffon vultures (*Gyps fulvus*). *Vet. Ital.* 53:243–249. doi:10.12834/VetIt.743.3616.2

Gilbert, M. 2014. Diclofenac and vulture populations. *The Veterinary Record* 174: 562.



Margalida, A., J.A. Donázar, M. Carrete, J.A. Sánchez-Zapata. 2010. Sanitary versus environmental policies: fitting together two pieces of the puzzle of European vulture conservation. *Journal of Applied Ecology* 47: 931–935.

Margalida, A., J.A. Sánchez-Zapata, G. Blanco, F. Hiraldo, J.A. Donázar. 2014. Diclofenac Approval as a Threat to Spanish Vultures. *Conservation Biology* 28: 631-632.

Moleón, M., J.A. Sánchez-Zapata, A. Margalida, M. Carrete, N. Owen-Smith, J.A. Donázar. 2014. Humans and scavengers: evolution of interactions and ecosystem services. *Bioscience* 64: 394-403.

Oaks, J.L., M. Gilbert, M.Z. Virani, R.T. Watson, C.U. Meteyer, B.A. Rideout, H.L. Shivaprasad, S. Ahmed, M.J. Chaudhry, M. Arshad, S. Mahmood, A. Ali, A.A. Khan. 2004. Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature* 427: 630-633.

Prakash, V., M. C. Bishwakarma, A. Chaudhary, R. Cuthbert, R. Dave, M. Kulkarni, S. Kumar, K. Paudel, S. Ranade, R. Shringarpure, R. E. Green. 2012. The population decline of Gyps vultures in India and Nepal has slowed since veterinary use of diclofenac was banned. *PloS ONE* 7: e49118.

Zorrilla, I., R. Martínez, M. Taggart, N. Richards. (2015) Suspected Flunixin mortality in a wild Eurasian griffon vulture from Spain. *Conservation Biology* 29: 587–592.



PRESENTACIÓ DELS TÈCNICS, INVESTIGADORS I INSTITUCIONS

Ignasi Marco, Professor Titular d'Universitat, Servei d'Ecopatologia de Fauna Salvatge (SEFaS), Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain, ignasi.marco@uab.cat

Oscar Cabezón, Investigador Ordinari, Servei d'Ecopatologia de Fauna Salvatge (SEFaS), Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain, ocabezon@yahoo.com

Rafaela Cuenca, Catedràtica d'Universitat, Servei d'Hematologia Clínica Veterinària, Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain, rafaela.cuenca@uab.cat

Josep Pastor, Professor Titular d'Universitat, Servei d'Hematologia Clínica Veterinària, Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain, ignasi.marco@uab.cat

Johan Espunyes, Becari predoctoral, Servei d'Ecopatologia de Fauna Salvatge (SEFaS) (Wildlife Health Research Group), Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain, johan.espunyes@uab.cat

Irene Torres, Veterinària Interna, Servei d'Ecopatologia de Fauna Salvatge (SEFaS), Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain, ireto3@gmail.com

Andrea Diaz, Veterinària Interna, Servei d'Ecopatologia de Fauna Salvatge (SEFaS), Departament de Medicina i Cirurgia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain, andrea.da114@gmail.com



Rafael Mateo, Professor Titular d'Universitat, Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC), Universidad de Castilla-La Mancha, Spain, rafael.mateo@uclm.es

PARTICIPANTS (si s'escau)



PREVISIÓ DE COSTOS

CONCEPTES	Euros
1. Despeses d'activitats	6.000 €
- Anàlisis toxicològiques de diclofenac i fàrmacs antiinflamatoris	2.800 €
- Anàlisis sanguínies (hemograma i bioquímica)	2.000 €
- Enviament de mostres sanguínies al “Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos”, Ciudad Real	100 €
- Viatges i dietes Deu viatges al lloc de captura dels voltors (Orís, Osona)	600 €
- Material de laboratori fungible per l'extracció i anàlisi de les mostres sanguínies	500 €
2. Personal	4.000 €
Sou parcial d'un tècnic de suport a la recerca	4.000 €
TOTAL	10.000 €



PLANIFICACIÓ DETALLADA I RELACIÓ DE MATERIALS

La fundació nord-americana "Morris Animal Foundation" és una organització sense ànim de lucre que inverteix en investigació per promoure la salut animal, inclosa la fauna salvatge. Recentment, aquesta fundació ha concedit un projecte d'investigació a un equip de diverses institucions espanyoles (Universitat Autònoma de Barcelona, Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos, Universitat de Lleida) i portugueses (Universitat d'Aveiro), així com el "Raptor Center" de la Universitat de Minnesota (EUA), per estudiar l'exposició dels voltors al diclofenac i a d'altres fàrmacs antiinflamatoris a la Península Ibèrica a partir dels animals que moren als Centres de Recuperació de Fauna Salvatge. Aquest estudi té com a objectius investigar la presència de residus i de toxicitat d'aquests fàrmacs en les aus carronyaires que moren o arriben mortes als centres de recuperació de fauna salvatge i detectar la possible presència d'aquests fàrmacs en les canals d'animals domèstics que s'utilitzen en punts d'alimentació controlats. A més, es realitzarà una anàlisi de risc amb les dades obtingudes de les anàlisis i informació que es reculli amb les enquestes a veterinaris i personal responsable dels punts d'alimentació d'aus carronyaires, per avaluar l'ús que s'està fent d'aquests fàrmacs i l'impacte que pot tenir en les poblacions ibèriques. Els resultats que s'obtinguin a partir d'aquest projecte proporcionaran informació clau a les autoritats veterinàries que regulen l'ús d'aquests fàrmacs, que ja estan prohibits en diversos països asiàtics des de 2006, i informaran per un futur procés de presa de decisions.

Amb l'esmentat projecte s'ha posat en funcionament la recollida de cadàvers d'aus rapinyaires carronyaires i de mostres dels voltors que es necropsien als centres de recuperació d'Espanya i Portugal. L'obtenció de mostres biològiques de les espècies d'animals salvatges, en especial de les espècies escasses i protegides, és un factor clau per la realització d'estudis científics. En el cas de la present proposta de projecte, volem ampliar l'estudi amb l'anàlisi dels voltors comuns vius que es capturen anualment a Orís (Osona), per part del Grup d'Anellament de Calldetenes-Osona (GACO).

L'extracció d'una mostra de sang es farà durant el marcatge dels voltors capturats. Les aus s'immobilitzaran físicament i es realitzarà una punció a la vena radial. La sang es



col·locarà en dos tubs amb anticoagulants, un amb EDTA tripotàsic (per la realització de l'hemograma) i un altre amb heparina (per les anàlisis toxicològiques), i en un tercer tub sense anticoagulant (per la obtenció de sèrum per les determinacions bioquímiques). Es farà un frotis sanguini assecat a l'aire per realitzar el recompte diferencial de leucòcits i per observar la seva morfologia. Les mostres de sang es mantindran en nevera, a una temperatura d'aproximadament 4°C, fins a l'arribada al laboratori del Servei d'Hematologia Clínica Veterinària, on es realitzarà l'hemograma complet (mostra amb EDTA) i es congelarà la mostra amb heparina i el sèrum fins a la realització de les anàlisis toxicològiques i bioquímiques.

La presència de diclofenac i d'altres fàrmacs antiinflamatoris, en concret flunixin, carprofen, ketoprofen i meloxicam, es determinarà en les mostres sanguínies mitjançant mètodes basats en cromatografia de líquids acoblada a espectrometria (Taggart et al. 2009. Analysis of nine NSAIDs in ungulate tissues available to Critically Endangered vultures in India. Environmental Science and Technology 43: 4561-4566).

Per l'hemograma, l'hematocrit es determinarà pel mètode de centrifugació del microhematocrito i els recomptes de eritròcits i leucòcits es determinarà mitjançant l'ús del mètode directe de recompte en cambra de Neubauer amb la solució de Natt i Herrick. La concentració d'hemoglobina es mesurarà espectrofotomètricament. Els índex eritrocitaris (MCV, MCHC i MHC) es calcularan usant les fórmules estàndard. El recompte diferencial de leucòcits es farà mitjançant l'avaluació microscòpica de 200 cèl·lules en un frotis de sang tenyit amb tinció Wright. Per últim, es farà una estimació del recompte total de trombòcits a partir del mateix frotis sanguini.

Es realitzarà un panell bioquímic sanguini estàndard per aus al Servei de Bioquímica Clínica de la Universitat Autònoma de Barcelona, mitjançant un analitzador Olympus AU400 (Olympus, Mainz, Alemanya). Es mesuraran els següents paràmetres: aspartat aminotransferasa (AST), creatin quinasa (CK), àcid úric, glucosa, urea, triglicèrids, glutamat deshidrogenasa (GLDH), fosfatasa alcalina (ALP), àcids biliars totals, alanin aminotransferasa (ALT), calci, fòsfor, amilasa, gamma-glutamil transferasa (GGT), creatinina, colesterol, magnesi, sodi, potassi i clorurs.



POSSIBLES PUBLICACIONS

Es realitzaran, com a mínim, dues publicacions científiques en revistes d'impacte, una amb els resultats obtinguts en la investigació de la presència de diclofenac i d'altres fàrmacs antiinflamatoris, i una altra amb els valors sanguinis (hematologia i bioquímica sanguínia) obtinguts.



PLA ESPECÍFIC DE COMUNICACIÓ I DIFUSIÓ DELS RESULTATS

Els resultats que s'obtinguin, seran publicats en revistes científiques de l'àmbit de les ciències veterinàries, en especial en aquelles que centren més el seu interès en la fauna salvatge, com el "Journal of Wildlife Diseases". Al mateix temps, aquests resultats es presentaran en congressos de l'àmbit de les malalties de la fauna salvatge (organitzats per la "European Wildlife Disease Association", EWDA) i de l'àmbit de la conservació (Sociedad Española de Ornitología, SEO).

Organitzacions no governamentals, com el Grup d'Anellament de Calldetenes-Osona (GACO), l'Institut Català d'Ornitologia (ICO), la Sociedad Española de Ornitología (SEO) i la Vulture Conservation Foundation (VCF), estan especialment interessades en l'estudi i conservació d'aquestes espècies, pel que els resultats es divulgaran a través dels seus canals (principalment pàgina web).

Es faran xerrades divulgatives a la Universitat, amb la col·laboració de l'Associació Veterinària d'Atenció a la Fauna Exòtica i salvatge (AVAFES), formada essencialment per estudiants de veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona.

S'editarà un vídeo de divulgació científica per la seva publicació a la pàgina web de la Universitat Autònoma de Barcelona (<http://www.uab.cat/videos>).

REQUERIMENTS SOL·LICITATS AL ZOO

No procedeix.