



UNIVERSIDAD  
ALFONSO X EL SABIO

## **TESIS DOCTORAL**

### ***Agentes patógenos zoonóticos en avifauna de parques y jardines***

MEMORÍA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Juan López Rodríguez**

#### **DIRECTORES**

Dr. Fernando Esperón Fajardo

Dra. María Mogedas Moreno

*“Encender una vela es proyectar una sombra...”*

**Ursula K. Le Guin**

## **CONTENIDO**

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>5</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>6</b>
<b>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS</b>	<b>7</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>9</b>
<b>1.-INTRODUCCIÓN</b>	<b>12</b>
1.1.-PAPEL DE LOS PARQUES URBANOS EN LAS GRANDES CIUDADES	12
1.2.-AVIFAUNA AUTÓCTONA URBANA	15
1.3.-FAUNA INTRODUCIDA	21
1.4.-ESPECIES INVASORAS	22
1.5.-PATÓGENOS ZONÓTICOS MÁS RELEVANTES EN LA FAUNA	26
1.5.1.-CAMPYLOBACTER JEJUNI. CARACTERÍSTICAS GENERALES	26
1.5.2.-Chlamydia psittaci. Características generales	28
1.5.2.1- Chlamydia psittaci en las especies de estudio	32
1.5.3. ENTEROBACTERIAS. CARACTERÍSTICAS GENERALES	33
1.5.3.1.- Salmonella spp en las especies de estudio	38
1.5.3.2.-Escherichia coli en las especies de estudio	39
1.5.3.3.-Otras enterobacterias	40
1.5.4.-INFLUENZA AVIAR. CARACTERÍSTICAS GENERALES	40
1.5.4.1.-Influenza Aviar en las especies de estudio	43
1.5.5.-VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE. CARACTERÍSTICAS GENERALES	45
1.5.5.1.- Virus de la Enfermedad de Newcastle en las especies de estudio	46
<b>2.-JUSTIFICACIÓN</b>	<b>48</b>
<b>3.-OBJETIVOS</b>	<b>51</b>
<b>4.-MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>52</b>
4.1.- ESTUDIO EN COTORRAS	52
4.1.1-CAPTURA	52
4.1.2.-TOMA DE MUESTRAS Y SELECCIÓN DE AGENTES PATÓGENOS	57
4.2.- ESTUDIO EN PATOS	57
4.2.2.-TOMA DE MUESTRAS Y SELECCIÓN DE AGENTES PATÓGENOS	60
4.3.- ESTUDIO EN PASERIFORMES	60
4.3.1.-CAPTURAS	61
4.3.2.-TOMA DE MUESTRAS Y SELECCIÓN DE AGENTES PATÓGENOS	63
4.4.-PRUEBAS LABORATORIALES	63
4.4.1. MÉTODOS MOLECULARES	64
4.4.1.1. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	64

4.4.1.2. DETECCIÓN DE PATÓGENOS POR MÉTODOS MOLECULARES	64
4.4.1.2.1.- CHLAMYDOPHILA PSITTACI	64
4.4.1.2.2.- CAMPYLOBACTER JEJUNI	64
4.4.1.2.3.- VIRUS DE LA INFLUENZA AVIAR	65
4.4.1.2.4.- VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE	65
4.4.2. CULTIVOS BACTERIOLÓGICOS	67
4.4.2.1.- PREENRIQUECIMIENTO	67
4.4.2.2.- CULTIVO DE SALMONELLA SPP	67
4.4.2.3.- CULTIVO DEL RESTO DE ENTEROBACTERIAS	67
4.4.2.4.- IDENTIFICACIÓN BACTERIANA POR MÉTODOS MOLECULARES	68
4.4.2.5.- DETECCIÓN DE E. COLI ZONÓTICAS	68
<b>4.5.-ESTUDIO ESTADÍSTICO</b>	<b>69</b>

## **5.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN 69**

<b>5.1.-COTORRAS</b>	<b>69</b>
5.1.1-RESULTADOS EN COTORRAS	69
5.1.2-DISCUSIÓN	71
<b>5.2.-ANÁTIDAS</b>	<b>74</b>
5.2.1-RESULTADOS EN ANÁTIDAS	74
5.2.2-DISCUSIÓN	78
<b>5.3-PASERIFORMES</b>	<b>83</b>
5.3.1-RESULTADOS EN PASERIFORMES	83
5.3.2-DISCUSIÓN	86
<b>5.4.-DISCUSIÓN GENERAL</b>	<b>88</b>

## **6.-CONCLUSIONES 94**

## **ANEXO 95**

## **BIBLIOGRAFÍA 102**

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.-Parques de Madrid con Fauna introducida y especies invasoras.
- Figura 2.-Ubicación del Parque de María Luisa en la ciudad de Sevilla.
- Figura 3.-Distribución por especies en el parque de Dehesa de la Villa (Madrid).
- Figura 4.-Evolución de la población de cotorra gris argentina entre los años 2002 y 2018.
- Figura 5.-Evolución de la población de cotorra de Kramer entre los años 2002 y 2018.
- Figura 6.-Casos comunicados de influenza aviar en EU en el año 2023.
- Figura 7.- Jardines del Campo del Moro.
- Figura 8.-Parque de las Cruces.
- Figura 9.-Parque del Oeste.
- Figura 10.-Instalación de una trampa colectiva sobre un árbol.
- Figura 11.-Trampa para córvidos con reclamos en el compartimento central.
- Figura 12.-Instalación de dispositivo de captura en nido.
- Figura 13.-Dispositivos de trampeo en nido y en suelo.
- Figura 14.-Trampa de tejado invertido.
- Figura 15.-Trampa de revólver.
- Figura 16.-Jardines del Buen Retiro.
- Figura 17.-Parque Juan Carlos I.
- Figura 18.-Madrid Río.
- Figura 19.-Red japonesa con pájaros capturados.
- Figura 20.-Cotorras y palomas compartiendo alimento en suelo.

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla 1.**-Preferencia de algunas especies en el uso de biotopos.

**Tabla 2.**-Censos en España y Madrid de las especies analizadas de passeriformes.

**Tabla 3.**-Número de casos humanos de campilobacteriosis confirmados y tasas de notificación (por 100.000 habitantes) en 2022.

**Tabla 4.**-Especies de Chlamydia por hospedadores según Cheong.

**Tabla 5.**-Genotipos por especies.

**Tabla 6.**-Número de casos confirmados de salmonelosis en humanos y tasas de notificación (por 100.000 habitantes) en 2022.

**Tabla 7.**-Número de casos confirmados de yersiniosis en humanos y tasas de notificación (por 100.000 habitantes) en 2022.

**Tabla 8.**-Número de casos confirmados de *E. coli* en humanos y tasas de notificación (por 100.000 habitantes) en 2022.

**Tabla 9.**-Datos de captura y análisis de cotorra gris argentina del Ayuntamiento de Madrid.

**Tabla 10.**-Datos de captura y análisis de cotorra de Kramer del Ayuntamiento de Sevilla.

**Tabla 11.**-Agentes patógenos analizados en cada parque y especie.

**Tabla 12.**-Datos de captura y análisis del Ayuntamiento de Madrid.

**Tabla 13.**-Agentes seleccionados en el estudio de patos.

**Tabla 14.**-Especies analizadas, número y lugar de origen.

**Tabla 15.**-Muestras para la detección de cada agente.

**Tabla 16.**-Cebadores empleados para cada agente.

**Tabla 17.**-Nº de positivos y prevalencia de cada patógeno en las dos especies de psitácidas.

**Tabla 18.**-Parque, año, estación, número de muestras y positivos y prevalencia de los patógenos analizados.

**Tabla 19.**-Parque, año, estación, número de muestras y positivos y prevalencia de los patógenos analizados.

**Tabla 20.**-Año de análisis y porcentaje de cada enterobacteria detectada.

**Tabla 21.**-Porcentaje de aparición de las distintas bacterias aisladas en el estudio, clasificado por especie.

## Abreviaturas y acrónimos

**Ac:** *Acinetobacter sp.*

**ADEC:** *Escherichia coli* de adherencia difusa

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**Ae:** *Aeromonas sp*

**Agc:** Agateador común

**AIV:** Avian Influenza Virus

**APEC:** *Escherichia coli* patógena aviar

**ARN:** Ácido ribonucleico

**At:** *Atlantobacter hermannii*

**Cac:** Carbonero común

**C.j.:** *Campylobacter jejuni*

**C.p.:** *Chlamydomphila psittaci*.

**Cr:** *Cronobacter sp.*

**Ct:** *Citrobacter sp*

**Cucb:** Curruca cabecinegra

**Cucp:** Curruca capiroxada

**Cut:** Curruca tomillera

**E. coli:** *Escherichia coli*

**eaeA:** Gen de la intimina de *E. coli*

**EAEC:** *Escherichia coli* enteroagregativa

**Ec:** Estornino común

**EFSA:** European Food Safety Agency

**EHEC:** *Escherichia coli* enterohemorrágica

**EIEC:** *Escherichia coli* enteroinvasiva

**El:** *Enterobacter ludwigii*

**En:** *Enterobacter sp.*

**EPEC:** *Escherichia coli* enteropatogénica

**Es:** *Escherichia sp.*

**ETEC:** *Escherichia coli* enterotoxigénica

**ExPEC:** *Escherichia coli* patógena extraintestinal

**G.:** Genotipo de *Chlamydomphila psittaci*

**Gc:** Gorrión común

**Gm:** Gorrión molinero

**Hc:** Herrerillo común

**IC:** Intervalo de Confianza

**IKA:** Índice Kilométrico de Abundancia

**IPIV:** Índice de Patogenicidad Intravenosa

**Ka:** *Klebsiella aerogenes*

**KPC:** *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa

**Kl:** *Klebsiella sp.*

**Klu:** *Kluyvera sp.*

**Lb:** Lavandera blanca

**Lc:** Lavandera cascadeña

**Mc:** Mirlo común

**mL:** Mililitros

**MLST:** Multilocus Sequence Typing

**Mm:** Mosquitero musical

**Mo:** *Morganella morganii*

**NDV:** Newcastle Disease Virus

**Pa:** *Pantoea agglomerans*

**PBS:** Phosphate Buffered Saline

**Pc:** Papamoscas cerrojillo

**PCR:** Polymerase Chain Reaction

**Pe:** Petirrojo europeo

**Po:** *Proteus sp.*

**Pr:** *Providencia sp.*

**Pra:** *Providencia alcalifaciens*

**Ps:** *Pseudomonas sp.*

**Psa:** *Pseudomonas aeruginosa*

**Ptr:** Pito real

**Pv:** Pinzón vulgar

**Ra:** *Ralstonia solanacearum*

**RD:** Real Decreto

**RT-PCR:** Reverse Transcription PCR

**RT-rtPCR:** Reverse Transcription rtPCR

**rtPCR:** real time PCR

**S.sp:** *Salmonella spp.*

**SARS-COC-2:** Severe Acute Respiratory  
Syndrome Coronavirus 2

**Sh:** *Shewanella sp.*

**Sm:** *Serratia marcescens*

**Sr:** *Serratia rubidae*

**STEC:** *Escherichia coli* productora de  
toxina Shiga

**VRBG:** Violet Red Bile Glucose Agar

**Ye.:** *Yersinia enterocolitica*

## RESUMEN

Actualmente el 56% de la población mundial vive en ciudades, y se calcula que para el año 2050, 7 de cada 10 personas vivirán en ellas. Por lo tanto, gran parte del contacto entre humanos y animales, aparte de las mascotas, se producen y se producirán en las áreas verdes de las grandes ciudades. Este contacto puede generar interacciones muy beneficiosas, pero también, potencialmente, la transmisión de agentes infecciosos entre fauna silvestre y seres humanos. Por ello, dentro del concepto “One Health”, la interacción entre la salud humana, la sanidad ambiental y la sanidad animal tendrá su máximo exponente en los grandes parques de las grandes ciudades. En este contexto, la avifauna de los parques y jardines desempeña un papel muy relevante, ya que es la que presenta una mayor interacción con el público, especialmente las aves ornamentales.

Este estudio tiene como objetivo principal conocer el estatus sanitario de esta avifauna, seleccionando para ello aves de los tres grandes grupos más representativos que podemos encontrar en los parques y jardines: 1- fauna invasora, empleando a la cotorra gris argentina (*Myiopsitta monachus*) y a la cotorra de Kramer (*Psittacula krameri*) como especies modelo, y que actualmente ocupan las grandes ciudades y con un aumento exponencial de población; 2- aves ornamentales, empleando a los patos domésticos e híbridos (*Anas* sp.) en semilibertad como especie representante del estado de salud de las láminas de agua de los grandes parques y que tienen un estrecho contacto con el público que los frecuenta a través del ocio y la alimentación; 3- aves paseriformes, el grupo más abundante de las especies silvestres que habitan estos espacios ajardinados, que, a su vez, presentan poblaciones migratorias y residentes.

La selección de esta tipología de aves nos permite establecer tres hipótesis/predictores: 1- que las especies invasoras podrían portar patógenos también exóticos para las poblaciones de destino; 2- que las especies ornamentales pueden ser buenas centinelas de los principales agentes zoonóticos; y 3- que las especies de paseriformes, especialmente las migratorias pueden difundir nuevas variantes de dichas enfermedades.

Como representación de los grandes parques urbanos se han realizado los muestreos en algunos de los más emblemáticos y visitados de grandes ciudades, como son los Jardines del Buen Retiro en Madrid o el Parque de María Luisa en Sevilla.

Los patógenos seleccionados para la determinación del estado sanitario de las poblaciones de aves de estos parques y su riesgo potencial para las personas que entran en contacto con ellas, son aquellos con más relevancia epidemiológica y algunas de declaración obligatoria, como *Chlamydia psittaci*, *Campylobacter jejuni*, enterobacterias como *Salmonella spp.* y cepas de *Escherichia coli* zoonóticas y el virus de la influenza aviar. También se ha incluido el virus de la enfermedad de Newcastle, que, a pesar de tener un escaso potencial zoonótico, adquiere mucha importancia por ser de declaración obligatoria en aves de producción.

Del estudio en avifauna invasora destacan las prevalencias del 23,8% de *Chlamydia psittaci* y del 9,5% de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) en cotorra gris (n=21), así como la presencia del virus de la influenza aviar en cotorras de Kramer (n=60), con una prevalencia de 13,3%, de EPEC, con un 15% y del virus de la enfermedad de Newcastle con un 3,3% de prevalencia. La caracterización molecular del gen *ompA* en los positivos a *Chlamydia psittaci*, demostró la presencia de genotipos E y E/B, presentes previamente en palomas bravías (*Columba livia*), hecho que sugiere una transmisión de palomas a cotorras grises.

En cuanto a la avifauna ornamental, se realizó el análisis sanitario de los patos domésticos de los Jardines del Buen Retiro (Madrid) a lo largo de 11 años, desde el 2008 hasta el 2020, con interrupción de los análisis en 2012 y 2013. También se incluyeron ejemplares residentes en el parque de Juan Carlos I en Madrid, capturados en 2009 y 2010. El patógeno más frecuente hallado en este estudio fue *Campylobacter jejuni*, con una prevalencia total del 13%, destacando también la detección del virus de la enfermedad de Newcastle en un 10,1% de los casos, además de prevalencias menores de *Salmonella spp.* (2,3%), *Chlamydia psittaci* (2%), *Escherichia coli* EPEC (0,6%), virus de la influenza aviar (2,3%) y *Yersinia enterocolitica* (0,6%).

Por último, se capturaron a conveniencia 63 aves paseriformes, pertenecientes a 17 especies diferentes, procedentes de dos parques a lo largo de septiembre de 2019: Juan Carlos I (n=24; predominio de aves residentes) y Madrid Río (n=39; predominio de aves migratorias). El estudio descartó la presencia de los principales agentes patógenos. En cuanto al resto de enterobacterias y otras bacterias Gram negativas, se obtuvieron un total de 18 aislados diferentes; destacando la presencia de *Aeromonas* sp., con una prevalencia general del 42,9%.

Los resultados obtenidos en la presente tesis sólo han permitido validar la segunda hipótesis formulada, ya que los patos domésticos actúan como buenos centinelas del estado de salud del medio, proporcionando información fundamental sobre el nivel de agentes zoonóticos presentes en los parques y jardines. También nos sugieren la interrelación entre distintas especies, como las palomas y las cotorras grises, donde existe una posible transmisión de agentes infecciosos entre ambas especies, y quizás, entre las palomas y las anátidas ornamentales. Esto pone de manifiesto la necesidad de controlar sanitariamente las poblaciones de especies introducidas (aves ornamentales y aves invasoras). Por último, una buena biodiversidad podría disminuir la transmisión entre estas especies, visto el papel de las paseriformes en cuanto a la epidemiología de las principales zoonosis de origen aviar.

# 1.-INTRODUCCIÓN

## 1.1.-Papel de los Parques urbanos en las grandes ciudades

Los parques urbanos tienen cada vez más importancia en las grandes ciudades, siendo unos valiosos indicadores de la calidad de vida de éstas. El concepto de parque urbano surgió en el siglo XIX, y su importancia es tal, que marca la configuración de las urbes en todo el mundo. Su inclusión en la ciudad es un elemento modulador de la contaminación y ayuda a controlar la temperatura y la humedad (Pincetl & Gearin, 2005).

Además, existe un efecto cohesionador debido al uso público, siendo un espacio de deporte individual o colectivo, esparcimiento y punto de encuentro social y familiar (Peters et al., 2010). En el entorno de las grandes ciudades, a veces son el único modo de disfrutar y conocer la naturaleza (Cranz & Boland, 2004), y se consideran islas de biodiversidad, donde pueden proporcionar un refugio para las que la ciudad suponga un entorno hostil (Cornelis & Hermy, 2004). Durante los últimos años, los medios urbanos se han ido reconociendo como puntos calientes de biodiversidad, tanto de especies de flora como de fauna, y su estudio ha permitido desarrollar actuaciones para la conservación. Al presentar una enorme diversidad de hábitats y heterogeneidad de microhábitats, pueden albergar una biodiversidad particularmente destacable para un paisaje urbano, pese a que su papel inicial sea el recreativo.

Estudiar la biodiversidad urbana es un asunto complejo, teniendo en cuenta la heterogeneidad de las grandes ciudades. Alternan zonas totalmente urbanizadas con zonas verdes, rastrojos, herbazales, plazas y parques, con una serie de recursos como alimento, agua, lugares para la anidación y refugio frente a los cambios estacionales.

El contacto entre personas y animales silvestres y en semicautividad se hace más patente y estrecho en parques dentro de la ciudad, destacando la oportunidad de interactuar, especialmente para los niños, con algunas especies animales no muy frecuentes en el terreno humano como palomas, patos, ardillas y pájaros. Los lugares que combinan agua

y diferentes tipos de plantas incluido árboles de gran porte, dan la oportunidad para atraer diferentes tipos de animales, y la introducción de fauna ornamental, por lo que son más visitados para la observación e interacción con gran diversidad de especies (Páramo & Mejías., 2004).

Dentro de los parques urbanos, la variabilidad de especies se correlaciona directamente con el tamaño de estos, observándose un aumento en las zonas de mayor tamaño (Strohbach et al., 2013). Además, hay una disminución de insectívoros en parques de pequeño tamaño, presentando sobre todo especies generalistas o granívoras (Chace & Walsh, 2006). La interacción de los animales con la población humana en los parques normalmente viene dada por los aportes de alimentación y el contacto con heces de animales, depositadas tanto en el suelo como en el mobiliario urbano, así como también en el agua de estanques y fuentes.

Si bien, algunos parques son islas dentro de las ciudades, muchos están comunicados por calles arboladas, que funcionan como corredores ecológicos para distintas especies (Fernández-Juricic & Tellería, 2000). Por último, hay que tener en cuenta como puntos de atracción de fauna, y por lo tanto de biodiversidad, los puntos en los que se realiza aporte de alimentación para la fauna ornamental en los parques, en los que la mayoría de aporte de comida está disponible para las demás especies que habitan el parque, favoreciendo principalmente a las especies generalistas y granívoras.

El presente estudio se ha hecho principalmente en Madrid, ciudad que cuenta con más de 6000 hectáreas de parques y zonas verdes. Son parques que cuentan con arbolado maduro, una superficie mínima para tener vegetación variada, y en algunos casos con láminas de agua que constituyen factores importantes de atracción de fauna.

A continuación, señalamos los más destacados según los parámetros de tamaño, tipo y diversidad de vegetación, presencia de fauna ornamental, láminas de agua y presencia de cajas nido (Figura 1).

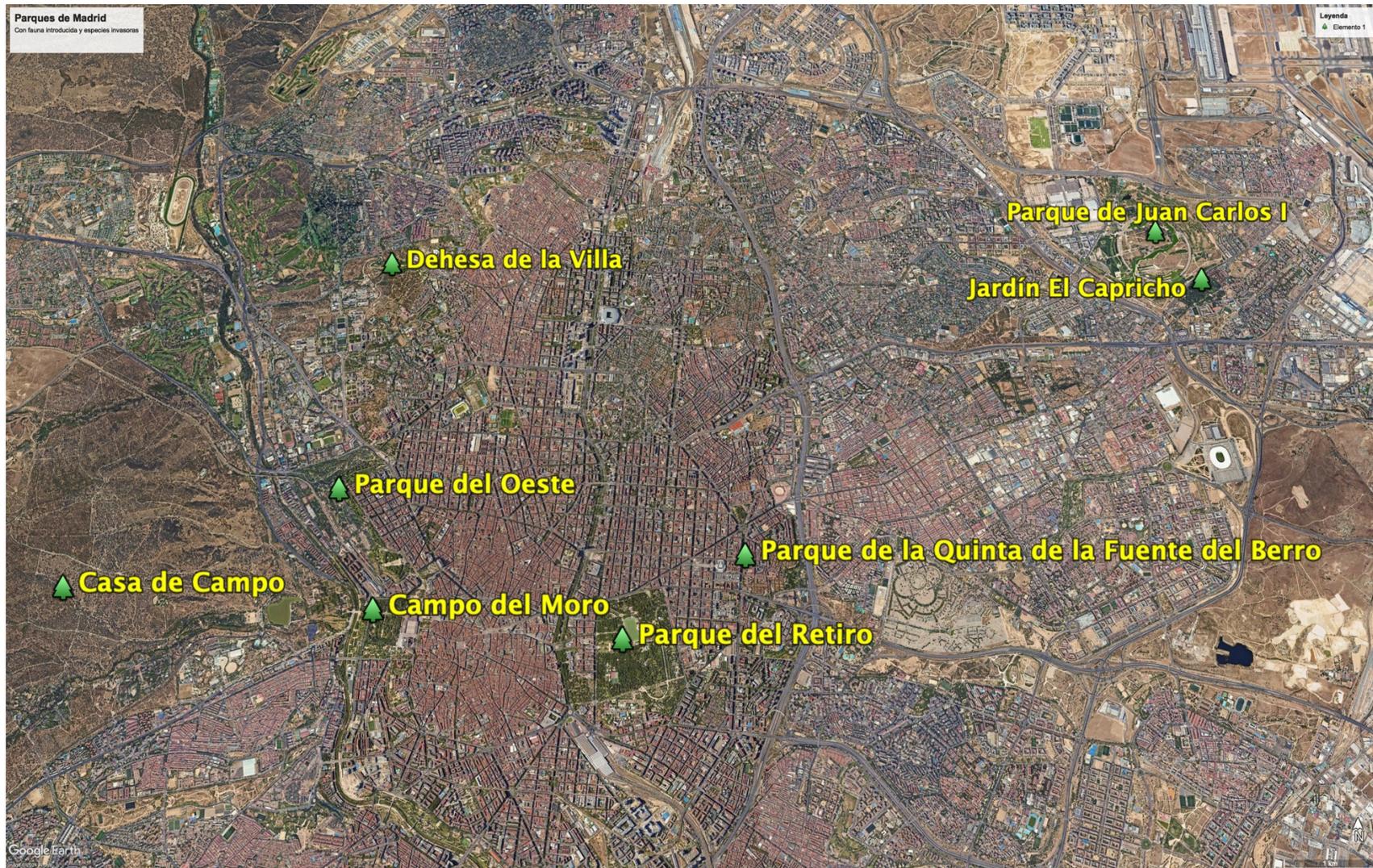


Figura 1.-Parques de Madrid con Fauna introducida y especies invasoras. Elaboración propia.

En Sevilla, uno de los parques más grandes y emblemáticos es el Parque de María Luisa, con una superficie de 340.000 m<sup>2</sup> cuadrados, y alberga la mayor diversidad de especies de la ciudad (Figura 2). Además, presenta la mayor población en Andalucía de cotorra de Kramer (*Psittacula krameri*), especie invasora cuyo número estimado es de 1798 ejemplares (López et al., 2019).



**Figura 2.**-Ubicación del Parque de María Luisa en la ciudad de Sevilla. Elaboración propia

## **1.2.-Avifauna autóctona urbana**

En las ciudades habita una gran diversidad de fauna. Como ejemplo, podemos citar las 62 especies de aves diferentes en el Parque del Oeste en Madrid, parque situado en medio de una gran ciudad (López et al., 2022). Entre esta avifauna se pueden distinguir las especies sinantrópicas, que se han adaptado totalmente al medio urbano, adecuando su ciclo, nidificación y alimentación a las poblaciones humanas, teniendo como consecuencia un claro aumento de su población, como por ejemplo la paloma bravía (*Columba livia*). Cabe destacar que esta especie de 2014 a 2015, aumentó su población en un 25% (Sainz-Borgo, 2021).

Dentro de la avifauna presente en los parques urbanos, se pueden distinguir dos grupos generales según la adaptación al entorno urbano: por una parte, aquellas que están habituadas a las actividades humanas, como los gorriones comunes (*Passer domesticus*) y las palomas bravías (*Columba livia*), y las que tienen requisitos específicos respecto al hábitat. Todas las especies que se alimentan en los árboles y en el suelo y anidan en árboles, excepto las dos especies citadas, tienen una menor abundancia e índice de reproducción sobre todo en parques pequeños, donde no hay mucha superficie interior para reducir el impacto del tráfico y del resto de actividades humanas (Fernández-Juricic, 2001).

Hacia los límites de los parques, existen modificaciones microclimáticas (Báldi, 1999), que pueden incidir en la escasez de recursos alimentarios, incluidos la disponibilidad de insectos. Así, en parques fragmentados o pequeños, donde hay más cantidad de espacio perimetral respecto al área interior, disminuirá la diversidad de aves, especialmente insectívoras (Bolsinger & Flückiger, 1989).

El tráfico de automóviles, al traspasar un nivel umbral el ruido que producen, disminuye la calidad del hábitat para la reproducción de las aves al aumentar el estrés y causar una distorsión en la comunicación vocal. Su combinación con el paso de peatones por los límites de los parques provoca disminución de abundancia y diversidad de especies, aumentando en los parques de superficie más pequeña (Reijnen et al., 1997). Como consecuencia, en las zonas limítrofes de los parques existe una disminución de la abundancia de aves (Patón et al., 2012). No obstante, algunas especies más generalistas como la urraca (*Pica pica*), el gorrión común (*Passer domesticus*) y la paloma bravía (*Columba livia*) se ven favorecidas, estando sus densidades directamente relacionadas con la urbana (Jokimaki & Suhonen, 1998). De hecho, algunas especies generalistas como el mirlo común (*Turdus merula*) se han adaptado al entorno humano, de tal manera que producen menores cantidades de corticosterona en respuesta al estrés en comparación con los que viven en entornos no urbanizados (Partecke et al., 2006).

Hay que destacar como un factor de impacto en las poblaciones de aves la presencia de gran número de perros y de gatos asilvestrados, cuya incidencia se ha documentado. Por ejemplo, en Canadá, las poblaciones de gatos matan entre 100 y 300 millones de aves por año (Blancher, 2013).

Así pues, los grandes parques urbanos se muestran como refugios de muchas especies de avifauna que de otra manera no podrían habitar un entorno considerado hostil para ellas por la falta de vegetación, láminas de agua accesibles y la alta densidad humana. En los parques, estas especies encuentran alimentación en forma de invertebrados y grano no existentes en las zonas asfaltadas y urbanizadas.

El uso que las aves realizan de los parques, y por lo tanto su abundancia, difiere notablemente entre especies. Algunas de estas aves se distribuyen en general por todo el espacio y utilizan muchos biotopos diferentes, obteniendo en cada momento los recursos que ofrece cada uno. En cambio, otras son más selectivas y se especializan en explotar determinados ambientes y recursos, por lo que pasan la mayor parte de su tiempo en lugares concretos y muy poco o nada en los demás. Las variables más influyentes en esta elección suelen ser el alimento y el refugio. Las especies generalistas tienden a aparecer en varios ambientes diferentes (menos del 25% de los individuos habitan un solo biotopo), variando según el momento del día. Por el contrario, para una especie que aparece más de un 75% en un solo biotopo, se considera que el uso que hace de otros ambientes es tan pequeño que resulta despreciable. Esto significa que depende de un biotopo para su supervivencia (López et al., 2022). Generalmente estos casos corresponden a especies con poblaciones escasas y con un Índice Kilométrico de Abundancia (IKA) bajo y pocas observaciones anotadas (López et al., 2022).

En la tabla 1 se representan en porcentaje algunos ejemplos de observaciones para cada especie usando un determinado biotopo en el Parque del Oeste de Madrid, que da una idea de la importancia de los biotopos dentro de cada parque.

ESPECIE	IKA	Pradera	Césped	Seto	Conífera	Pinar	Caducifolio	Perennifolio	Infraestructura	Vuelo	Agua
Agateador europeo	1,03	0%	0%	8%	42%	11%	32%	8%	0%	0%	0%
Ánade real	0,50	33%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	17%	50%
Carbonero común	2,61	1%	21%	17%	19%	4%	27%	7%	2%	1%	0%
Cotorra argentina	6,81	6%	32%	9%	25%	9%	13%	0%	0%	7%	0%
Cotorra Kramer	3,08	0%	1%	0%	2%	6%	43%	2%	19%	27%	0%
Curruca capirotada	0,58	0%	0%	52%	5%	0%	33%	0%	0%	5%	5%
Estornino negro	8,84	1%	37%	0%	11%	8%	33%	6%	0%	5%	0%
Gorrión común	5,59	2%	59%	3%	1%	0%	20%	9%	3%	3%	0%
Gorrión molinero	10,57	2%	54%	14%	5%	3%	19%	3%	0%	0%	1%
Herrerillo común	1,89	3%	5%	18%	5%	3%	46%	17%	3%	0%	0%
Lavandera blanca	0,26	22%	44%	0%	0%	0%	0%	0%	11%	0%	22%
Lavandera cascadeña	0,05	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%
Mosquitero común	0,74	0%	14%	32%	18%	0%	36%	0%	0%	0%	0%
Paloma doméstica	6,64	6%	52%	0%	6%	4%	2%	12%	9%	6%	4%
Papamoscas cerrojillo	0,34	0%	31%	23%	0%	0%	23%	8%	0%	15%	0%
Petirrojo europeo	1,13	0%	26%	19%	17%	7%	10%	19%	2%	0%	0%
Pinzón vulgar	1,07	8%	49%	8%	0%	5%	30%	0%	0%	0%	0%
Pito real ibérico	1,14	5%	41%	0%	10%	7%	22%	10%	0%	5%	0%
Urraca	9,22	9%	58%	1%	6%	8%	9%	2%	3%	4%	0%

**Tabla 1.-** Preferencia de algunas de las especies en el uso de los biotopos (SCROFA, 2022).

El arbolado caducifolio y las coníferas son los entornos visitados por un mayor número de especies, las cuales utilizan dicho estrato para múltiples acciones (nidificación, refugio, alimentación, posadero, etc.). Las áreas con césped aglutinan también un gran número de especies, siendo su uso exclusivamente de búsqueda de alimento (López et al., 2022). Por otra parte, el uso que hacen las aves del agua (principalmente para beber o como baño) es de vital importancia en su actividad diaria. El número de especies que dependen de dicho elemento es por tanto mayor que el promedio, aunque detectar dichos comportamientos es por lo general complicado, pues las aves suelen mostrarse

más esquivas. Además, varias especies acuáticas como el ánade real (*Anas platyrhynchos*) o la lavandera cascadeña (*Motacilla cinerea*) dependen directamente del agua o de la vegetación asociada, convirtiendo a esta variable en un elemento natural fundamental del parque (López et al., 2022).

Dentro de las aves que habitan los parques, toma relevancia el orden *Passeriformes*, que abarca más de la mitad de todas las especies de aves del mundo (Cracraft & Barker, 1987). Son el grupo de vertebrados terrestres más diversificado, con más de cinco mil setecientas especies identificadas. Está dividido en tres subórdenes: dos principales, *Passeri* (pájaros cantores) y *Tyranni* (pájaros clamadores), y un tercero más reducido, *Acanthisitti*. La mayoría son aves de pequeño tamaño, aunque alguna alcanza gran porte como los córvidos y las aves del paraíso. En la tabla 2 se exponen las poblaciones de las aves paseriformes estudiadas en Madrid y en el conjunto de España.

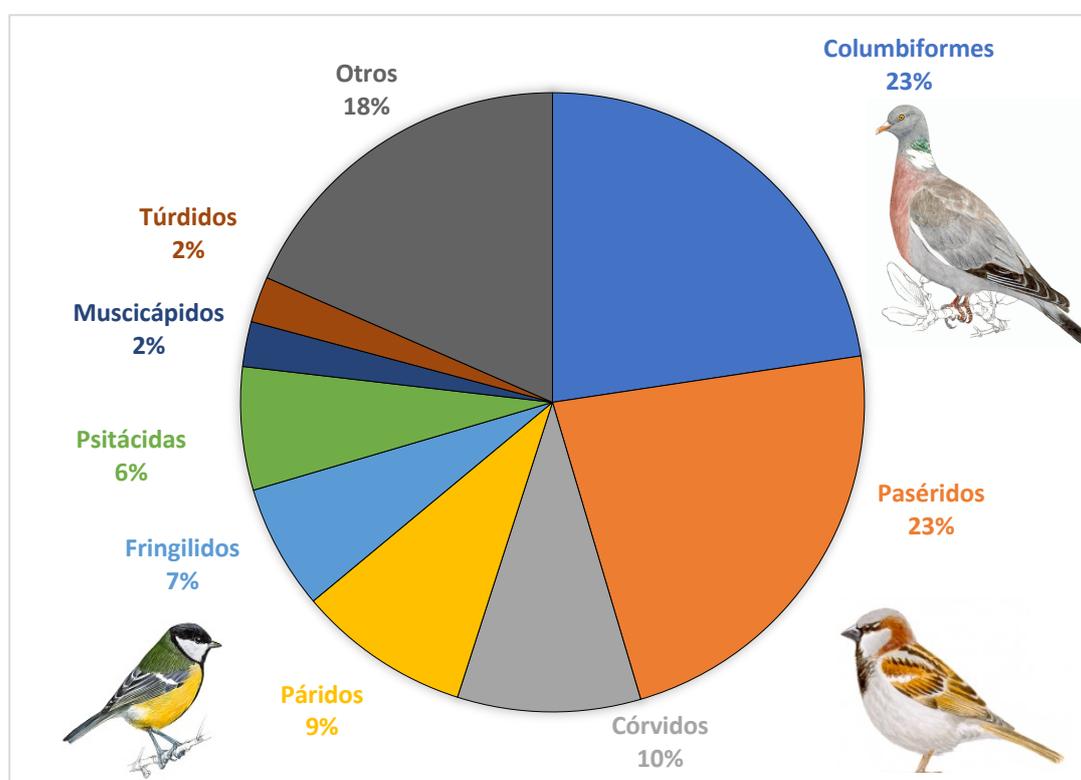
Especie	Nombre científico	Nº promedio Madrid	Nº promedio España
Agateador común	<i>Certhia brachydactyla</i>	67.465	<b>3.019.080</b>
Carbonero común	<i>Parus major</i>	193.666	<b>10.382.241</b>
Curruca cabecinegra	<i>Sylvia melanocephala</i>	222.068	<b>7.611.326</b>
Curruca capirotada	<i>Sylvia atricapilla</i>	153.3742	<b>5.638.51</b>
Curruca tomillera	<i>Sylvia conspicillata</i>	10.832	<b>550.637</b>
Estornino común	<i>Sturnus vulgaris</i>	-	-
Gorrión común	<i>Passer domesticus</i>	835.551	<b>31.124.8473</b>
Gorrión molinero	<i>Passer montanus</i>	83.211	<b>2.588.451</b>
Herrerillo común	<i>Cyanistes caeruleus</i>	168.712	<b>8.545.223</b>
Lavandera blanca	<i>Motacilla alba</i>	34.094	<b>1.700.480</b>
Lavandera cascadeña	<i>Motacilla cinerea</i>	9.472	<b>515.496</b>
Mirlo común	<i>Turdus merula</i>	253.406	<b>14.571.066</b>
Mosquitero musical	<i>Phylloscopus Trochilus</i>	-	-
Papamoscas cerrojillo	<i>Ficedula hypoleuca</i>	-	<b>700.000</b>
Petirrojo europeo	<i>Erithacus rubecula</i>	189.719	<b>7.123.348</b>
Pinzón vulgar	<i>Fringilla coelebs</i>	264.751	<b>14.436.230</b>
Pito real	<i>Picus sharpei</i>	7.873	<b>397.262</b>

**Tabla 2.-** Censos en España y Madrid de las especies analizadas de paseriformes.

Fuente: III Atlas de las aves en época de reproducción. Seo/BirdLife (Molina et al 2018)

Tomando como muestra el último censo de avifauna elaborado en el parque Dehesa de la Villa de Madrid (Figura 3), se puede observar la distribución aproximada por especies que se pueden encontrar en un parque urbano. La mayor población pertenece a las columbiformes (paloma bravía, torcaz y zurita), igualada con la población de *Passeridae* (gorriones). Estas poblaciones tienen especial interés para el objeto de este estudio, ya que su dieta granívora aumenta las posibilidades del contacto con otras especies estudiadas con la misma dieta en la competencia de comida, principalmente aportada por los servicios de los parques y por el público visitante.

Esta interacción, dependiendo del aporte de comida y la densidad de población, puede llevar al contagio de diversas enfermedades que no ocurriría en otras circunstancias, amplificando la prevalencia de algunas enfermedades, actuando a veces como reservorios y la aparición de nuevas enfermedades en especies no habituales, como resultado de la interacción con especies introducidas con otro estatus sanitario, como las psitácidas o anátidas, presentes en los parques como especie invasora u ornamental en distintas colecciones.



**Figura 3.-** Distribución por especies en el parque de Dehesa de la Villa (Madrid). Fuente; SCROFA S.L.

### **1.3.-Fauna introducida**

En muchos parques urbanos se introducen colecciones de aves para la observación y disfrute de los visitantes de los parques. Algunos de estos animales se introducen dentro de un proyecto de enriquecimiento, como los pavos reales y colecciones de anátidas autóctonas o exóticas, y en otros casos de forma desordenada como consecuencia de la liberación de aves por particulares, como en el caso de las anátidas domésticas. Estos animales son alimentados regularmente por los servicios de los parques, pero gran parte del tiempo lo hacen de lo que aportan los visitantes y de los recursos del parque en particular. Aunque en general estas poblaciones están controladas, tanto en número como su estado sanitario, al no estar encerradas en un recinto puede haber picos de superpoblación, con la consiguiente bajada de inmunidad y aparición de enfermedades nuevas o subclínicas.

A diferencia de la población silvestre y la invasora de los parques, estas especies están estabuladas y censadas dentro de los parques, sin contacto con el exterior que no medie a través de la interacción con otras especies con capacidad de vuelo que no reside en los parques de continuo. El caso más común y a la vez más interesante es el de las anátidas domésticas, que debido a su selección no tienen capacidad de vuelo, permaneciendo siempre dentro de los límites de los parques. Sin embargo, al vivir en superficies de agua habituales en ellos, entran en contacto con poblaciones de anátidas silvestres, sobre todo con ánades reales, que paran a descansar en sus migraciones, mudas o para la reproducción, ya que, además de abundante agua incluso en periodo de sequía, hay alimento fácilmente accesible. Este contacto puede llevar a contagios de enfermedades que puedan tener estos patos silvestres a las colecciones de patos existentes en los parques, y su presencia continuará aun cuando los patos portadores ya no se encuentren en el mismo entorno (De las Nieves, 2020). Por otra parte, estos animales son los que suelen tener un contacto más estrecho con los trabajadores y visitantes del parque, ya que se mueven en las mismas zonas y en muchas ocasiones son alimentados a mano, interactuando con las personas, especialmente niños.

## 1.4.-Especies invasoras

La introducción de especies exóticas puede acarrear graves daños medioambientales. Uno de los más importantes es la introducción de enfermedades exóticas, que al contacto con las especies autóctonas pueden ocasionar una pérdida de la biodiversidad sin parangón. Existen numerosos reportes de este daño, como el detrimento poblacional de numerosas especies de anfibios a nivel mundial por el hongo *Batrachochytrium dendrobatidis*, presente naturalmente en la rana invasora *Xenopus laevis* (Stuart et al., 2004). O el decline de la ardilla roja europea (*Sciurus vulgaris*) en el Reino Unido a causa de la transmisión de un poxvirus presente en la introducida ardilla gris americana (*Sciurus carolinensis*) (Sainsbury et al., 2008).

Así mismo, puede llevar consigo la emergencia o reemergencia de enfermedades zoonóticas (Hulme, 2021), como por ejemplo, el papel de los coipos (*Myocastor coypus*), introducidos en Francia en la diseminación de leptospiras zoonóticas (Michel et al., 2001), o el caso de los mapaches introducidos en Polonia, que, entre otros, son hospedadores de parásitos como el nematodo *Baylisascaris procyonis* (Popiołek et al., 2011), que causa en humanos un cuadro neurológico por *larva migrans* cerebral. Esta enfermedad sólo existía en el continente americano, pero por la introducción del mapache, ahora está presente en Europa.

Dentro de las especies invasoras que habitan nuestros parques urbanos, la cotorra gris argentina (*Myopsitta monachus*) y la cotorra de Kramer (*Psittacula krameri*), destacan (BOE-A-2013-8565) y se hallan en constante incremento. En 2016 se calculaba una población de entre 18980 y 21455 ejemplares en España de cotorra gris (Molina et al., 2016) y entre 3005 y 3115 de cotorra de Kramer (Del Moral et al., 2017) en el año 2015.

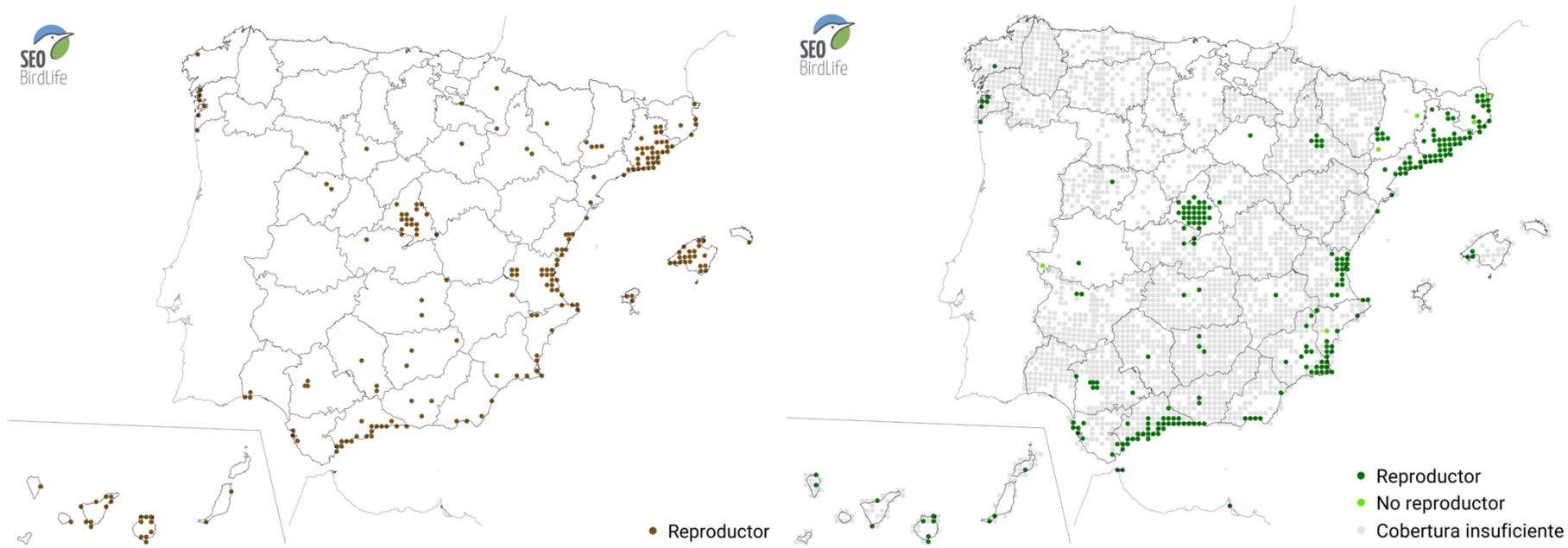
Desde entonces la población de cotorra gris argentina no ha parado de aumentar, y aunque no hay un censo nacional más reciente, sólo en el municipio de Madrid pasaron de entre 7248 y 8193 individuos en el 2016 a una horquilla de entre 11154 y 12975 en tan solo 3 años (Nebreda et al., 2019).

La cotorra gris argentina es un ave psitaciforme de la familia *Psittacidae*, originaria de América del Sur, y que se adapta muy bien a distintas condiciones ambientales, lo que le ha llevado a una rápida expansión después de una introducción en numerosos países fuera del continente americano.

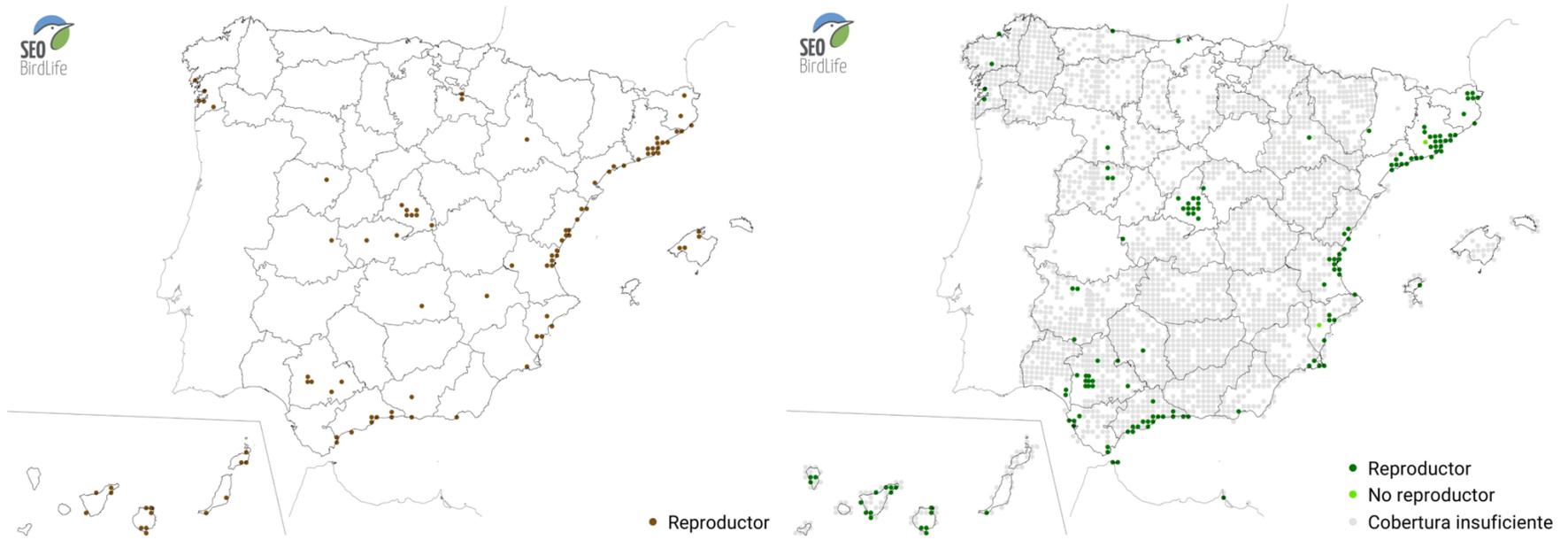
Las poblaciones de España provienen principalmente de Uruguay (Edelaar et al., 2015), cuando se importaron miles de ejemplares como mascotas. Su liberación intencionada o accidental, sobre todo en las grandes ciudades, lleva a que la distribución esté centrada sobre todo en estas grandes urbes (Pruett-Jones, 2021.). Construyen nidos comunales, a veces de gran tamaño, y se ha comprobado que gran parte de la población española tiene una segunda puesta y más de la mitad de los juveniles se reproducen en su primer año, a diferencia de sus hábitats de origen (Senar et al., 2021)

La cotorra de Kramer también es un ave psitaciforme, pero de la familia *Psittaculidae*, cuyo hábitat originario es África y el sur de Asia. A diferencia de la cotorra argentina, tiene dimorfismo sexual, presentando los machos un anillo rosa y negro en el cuello. Su introducción tuvo lugar en la década de 1960, y las poblaciones en Europa son una mezcla de las cuatro subespecies que existen, aunque predominan las subespecies asiáticas (Jackson et al., 2015). Sus poblaciones en España se distribuyen principalmente en las ciudades de Barcelona, Madrid, Sevilla y zonas costeras (Figuras 4 y 5).

Estos hechos ponen de manifiesto la necesidad de incluir el componente sanitario en los análisis de riesgo de la presencia de especies invasoras, tanto por la introducción de nuevas enfermedades como de los cambios en la epidemiología de las enfermedades ya presentes (Andersen et al., 2004). En este sentido, hay que tomar en cuenta que la cotorra argentina es una psitácida con comportamiento colonial, cuyos nidos comunales son ocupados por otras especies (Molina et al., 2016), lo que facilitaría la entrada, difusión, mantenimiento, amplificación y dispersión de los agentes patógenos. La cotorra de Kramer no construye nidos comunales, pero en época post reproductiva se agrupa en dormideros alcanzando una gran densidad de animales, compartiendo por lo tanto el mismo riesgo



**Figura 4.** Evolución de la población de cotorra gris argentina entre los años 2002 y 2018. Fuente: III Atlas de las aves en época de reproducción. Seo/BirdLife (Molina et al 2018)



**Figura 5.** Evolución de la población de cotorra de Kramer entre los años 2002 y 2018. Fuente: III Atlas de las aves en época de reproducción. Seo/BirdLife (Molina et al 2018)

## **1.5.-Patógenos zoonóticos más relevantes en la fauna**

El presente apartado no pretende ser una revisión exhaustiva de los patógenos presentes en las aves silvestres, sino que se enfocará en los patógenos que se han estudiado en los distintos capítulos de la tesis. Cada patógeno presente en la revisión tiene un apartado de características generales y epidemiología, y otro sobre los estudios publicados en las especies de la presente tesis (cotorras, anátidas en semilibertad y passeriformes). Los patógenos se han seleccionado por su potencial zoonótico y por su frecuencia de aislamiento y susceptibilidad potencial en la Clase Aves. Al final, se han seleccionado: *Campylobacter jejuni*, *Chlamydia psitaci*, enterobacterias (incluyendo *E. coli* y *Salmonella* spp.), influenza aviar y enfermedad de Newcastle. Este último agente, a pesar de que posee un potencial zoonótico leve, se ha incluido en el estudio debido a su importancia en avicultura y su presencia ya demostrada en aves silvestres de Madrid (Esperón et al., 2014).

### **1.5.1.-*Campylobacter jejuni*. Características generales**

La familia *Campylobacteriaceae* está formada por *Campylobacter*, *Arcobacter* y *Bacteoides ureolyticus*, y se encuentran principalmente en la mucosa digestiva, como comensales en humanos y animales (Duim et al., 2001). Es la causa más frecuente de enteritis en la población humana en la Unión Europea, con una tasa de 43,1 sobre 1000.000 habitantes (Tabla 3), pudiendo ser aún mayor, debido a que la mayoría de los casos no se declaran (García et al., 2013).

En el ser humano genera una enfermedad gastrointestinal autolimitada que dura hasta 7 días, aunque puede ir desde asintomática hasta sepsis con algunos casos de muerte, sobre todo en personas inmunodeprimidas. Además, se asocia con complicaciones post infecciosas como artritis y síndrome de Guillain-Barré. (Man, 2011). El contagio en humanos se produce por la ingestión de carne contaminada, principalmente de aves, que han sufrido un bajo proceso de cocción. Por su parte, el contagio entre animales es

por contacto de heces de aves infectadas, siendo los reservorios silvestres más relevantes las aves, y muy especialmente las passeriformes, columbiformes y anseriformes, que pueden contaminar el agua de bebida de los pollos de granja (García et al., 2013).

Por otra parte, existe controversia acerca del poder patogénico de *C. jejuni* en las aves, considerándose en general, que forma parte de la microbiota de las aves sanas; si bien cada vez existen más evidencias de que esta bacteria puede tener efectos deletéreos en aves de producción (Awad et al., 2018). Por ejemplo, se ha descrito en aves con enteritis, deshidratación, pérdida de apetito y anorexia, sin una gran mortalidad asociada (Man, 2011)

	2022		2021		2020		2019		2018	
	Casos	Tasa								
<b>España</b>	20.816	60,1	20.748	60,0	6891	-	9658	-	18.410	-
<b>UE</b>	137.107	43,1	137.317	43,1	120.543	40,2	161.921	54,0	181.324	58,3

**Tabla 3.-** Número de casos humanos de campilobacteriosis confirmados y tasas de notificación por 100.000 habitantes, en España y en la UE en el periodo 2018-2022. (EFSA Journal, 2023).

### 1.5.1.1.-*Campylobacter jejuni* en las especies de estudio

Existen pocos estudios sobre la presencia de *Campylobacter jejuni* en las cotorras de Kramer y gris, siendo la mayoría negativos. Esto incluyen estudios serológicos, como el realizado en Chile en seis cotorras de Kramer y en dos grises, siendo todos negativos (Gonzalez, 2006). Así mismo, en Italia, se buscó el patógeno mediante cultivo y caracterización mediante *multilocus sequence type* (MLST) (De Luca et al., 2018), en un ejemplar de cotorra gris y otro de Kramer, siendo ambos negativos. El único resultado positivo publicado se ha reportado en Irán, donde en los análisis por PCR en seis cotorras de Kramer cautivas fueron positivas 4 de ellas a *Campylobacter jejuni* (Seifi et al., 2019).

En cuanto a las anátidas, existen varios estudios con patos de granja empleando el cultivo como técnica de detección, como uno de los primeros estudios que data de 1992 en

Portugal (Cabrita, 1992), con un muestreo de 21 patos (entre domésticos y salvajes, sin especificar), y que obtuvo, mediante cultivo e identificación bioquímica un resultado el 19% de prevalencia a *C. jejuni*. Colles encontró un 69% de prevalencia de *C. jejuni* en 120 patos de granja en Inglaterra, frente al 52% en una muestra de 100 ánades reales silvestres; si bien en estos últimos el 90% era *C. coli* (Colles et al., 2011) . Otro estudio en Tanzania (Nonga, 2009) en 90 patos criados en libertad, se encontraron 59 positivos a *C. jejuni* por cultivo. Otros trabajos de detección en patos vivos de mercado de *C. jejuni* como los realizados en Irán con 291 patos (Jamali et al., 2014a), detectaron un 33,6% de positivos a de *C. jejuni*. En Malasia, en 75 patos, esta vez de granja, detectaron un 2,6% de positivos (Faiza et al., 2013). Por último, en Taiwan, con un número de 2400 muestras de patos, también de granja, se encontraron un 41,3% de positivos a *C. jejuni* (Tsai & Hsiang, 2005). En una revisión realizada en patos en el año 2012, se plantea una prevalencia media del 53% de *Campylobacter jejuni* a nivel global (Adzitey et al., 2012).

También en patos, esta vez de granja, un estudio compara las técnicas de detección tradicionales (cultivo e identificación bioquímica), con las técnicas de PCR (Boonmar, 2007). En el contenido intestinal de 140 individuos obtiene una prevalencia mayor empleando la PCR (31%), comparada con la técnica de cultivo (20%).

Existe apenas un estudio publicado de *Campylobacter* en passeriformes. En Croacia, con un análisis mediante cultivo e identificación en 107 aves, entre las que se encontraban 20 passeriformes, todas estas fueron negativas a *Campylobacter* (Vlahović et al., 2004).

### **1.5.2.-*Chlamydia psittaci*. Características generales**

La familia *Chlamydiaceae* es de gran importancia tanto en patología animal como en humana, causante de la zoonosis conocida como clamidiasis u ornitosis.

Pertenecen al filo *Chlamydiota*, orden *Chlamydiales*. Actualmente, los géneros propuestos por Everett *Chlamydia* y *Chlamydophila* se pueden agrupar en un solo género, *Chlamydia/Chlamydophila*, aunque esto sigue siendo fuente de debate (Cheong et al., 2019) (Tabla 4).

Se trata de cocos Gram negativos, caracterizados por un parasitismo intracelular obligado y que tienen una propensión a infectar la mucosa, lo que puede causar enfermedades tanto en humanos como en animales (Knittler&Saachse, 2015). Una característica compartida por todos los miembros de *Chlamydiaceae* es el ciclo de desarrollo bifásico conservado, que alterna respectivamente entre el cuerpo reticulado y el cuerpo elemental, representando las etapas de replicación e infección, respectivamente. Estos organismos también pueden entrar en una etapa persistente que actúa como una estrategia de adaptación ante condiciones hostiles como la inmunidad del hospedador y la privación de nutrientes, lo que permite su supervivencia a largo plazo dentro de la célula hospedadora (Knittler&Saachse, 2015).

La persistencia y la naturaleza asintomática de la infección por *Chlamydiaceae* en los humanos a menudo conducen a un subdiagnóstico y un tratamiento tardío, lo que aumenta la carga global de enfermedades causadas por clamidias (Knittler & Sachse, 2015).

Dentro de la familia se diferencian las siguientes especies:

Especie	Hospedador
<i>C. abortus</i>	Pequeños rumiantes
<i>C. avium</i>	Aves
<i>C. caviae</i>	Cerdos, gatos, perros, conejos y caballos
<i>C. corallus</i>	Serpientes
<i>C. felis</i>	Gatos y perros
<i>C. gallinácea</i>	Gallinas, patos y pavos
<i>C. ibidis</i>	Ibis sagrado
<i>C. suis</i>	Suidos
<i>C. muridarum</i>	Roedores y gallinas
<i>C. pecorum</i>	Koala, grandes y pequeños rumiantes, cerdos y aves
<i>C. pneumoniae</i>	Humanos, caballos, reptiles y anfibios
<i>C. sanzinia</i>	Serpientes
<i>C. psittaci</i>	Aves
<i>C. trachomatis</i>	Humana
<i>C. serpentis</i>	Serpientes

**Tabla 4.-** Especies de *Chlamydia* por hospedadores según Cheong (Cheong et al., 2019)

Una de las especies más importantes es la *C. psittaci*, que produce la enfermedad conocida como psitacosis en aves psitácidas y clamidiasis aviar en el resto de las aves. En aves se transmite principalmente por vía aerógena y en menor medida por vía digestiva por aerosoles de heces secas, y todas las aves son susceptibles de contraer la enfermedad (Vanrompay et al., 1993). Puede cursar de forma asintomática o de forma aguda, subaguda o crónica, con inapetencia, retraso en crecimiento, plumas erizadas, síntomas respiratorios, diarrea, depresión, cojeras y hasta convulsiones (Herrmann et

al., 2006). En el caso de aves de corral, también con ceguera y pérdida de peso progresiva (Vanrompay et al., 1993). Es importante resaltar que su transmisión a mamíferos está cada vez más comprobada (Osman et al., 2012.; Schautteet & Vanrompay, 2011).

Se distinguen varios genotipos empleando anticuerpos monoclonales para la proteína principal de la membrana, resultando un total de seis genotipos de aves y dos de mamíferos, cada uno con distinta especificidad en cuanto a hospedadores. En las aves, el serotipo A se aísla principalmente en psitácidas (Sutherland et al., 2019; Vanrompay et al., 1997), el B en palomas (Magnino et al., 2009), el C principalmente en patos y gansos (Stokes et al., 2021), el D en pavos, el E y E/B en palomas y gansos (Qin et al., 2022) y el F en psitácidas (Andersen, 1991; Sachse et al., 2015; Stokes et al., 2021) (Tabla 5).

Genotipo	Hospedador
A	Psitácidas
B	Palomas
C	Aves acuáticas
D	Pavos
E	Palomas; otras
E/B	Palomas y gansos
F	Psitácidas
M56	Mamíferos
WC	Mamíferos

**Tabla 5.** Genotipos por especies (Stokes et al., 2021; Qin et al., 2022).

En humana se trata principalmente de una zoonosis por contacto con secreciones aéreas o por los aerosoles de heces secas. El contagio de persona a persona es muy raro, aunque en algún caso se ha constatado (McGuigan et al., 2011). En personas cursa muchas veces de forma parecida a una gripe, pero en casos graves puede llevar a encefalitis, neumonías y endocarditis (Fraeyman et al., 2010).

Tradicionalmente los métodos de detección de *Chlamydia psittaci* se han basado en métodos serológicos, cultivo e identificación y microscopía mediante tinción y detección de anticuerpos sin cultivo previo (Galán et al., 2012), aunque actualmente ha avanzado notablemente con técnicas más sensibles como la PCR, que no depende de aislamientos y la sensibilidad de la detección aumenta considerablemente (Gruffydd-Jones & Lloret, 2009, Mcelnea et al., 1999).

#### 1.5.2.1- *Chlamydia psittaci* en las especies de estudio

El primer estudio de detección de *C. psittaci* en las especies de cotorras seleccionadas en el presente estudio (*Psittacula kramerii* y *Myiopsitta monachus*), se remonta a 1997, empleando los métodos de inoculación en huevos embrionados y ELISA en aves de colección (Chahota et al., 1997), siendo positivas dos cotorras de Kramer (*Psittacula kramerii*) sobre 19 individuos. Siguiendo con la cotorra de Kramer, destaca un estudio sobre un total de 15 individuos procedentes de Irán (Madani & Peighambari, 2013), empleando la PCR, de los cuales tres fueron positivos. Dos de ellas se consiguieron genotipar, clasificándose de forma provisional en un nuevo genotipo, el J. En otro estudio en Irán (Mina et al., 2019), se detectaron ocho positivos sobre 20 ejemplares, genotipando cuatro de ellas, dos como genotipo A y dos como B. En Francia, sobre 85 cotorras de Kramer, cinco fueron positivas a una PCR universal frente al género *Clamidia*, pero sin identificarse la especie (Pisanu et al., 2018).

Sobre la cotorra gris argentina (*Myiopsitta monachus*), el único estudio con resultados positivos a *C. psittaci* fue en Buenos Aires (Origlia et al., 2019) con el análisis de 29 aves cautivas con signos de enfermedad, de las que 9 fueron positivas por rtPCR.

Es importante resaltar que, hasta la fecha, todos los estudios realizados en ambas especies de cotorras se han realizado en poblaciones de cautividad, desconociendo, por tanto, su impacto en las poblaciones silvestres, tanto en sus áreas de distribución naturales como en las introducidas.

El único estudio de detección de *Chlamidia psitaci* mediante rtPCR en patos se realiza en Francia, donde 26 patos llegados al matadero fueron positivos, de un total de 570, analizados (Hulin et al., 2015). El resto de los estudios se han realizado mediante pruebas indirectas o mediante la visualización de cuerpos de inclusión compatibles. Destaca el estudio realizado mediante análisis serológicos en China (Cong et al., 2013) sobre un total de 334 patos domésticos en jaula y en semilibertad, sobre los cuales se detectaron 130 positivos. También, en Egipto, se detectaron cuerpos de inclusión compatibles con *Chlamydia* en aproximadamente un 40% de 50 patos, dentro de un análisis sobre varias especies (Hegazy et al., 2014).

Como se puede observar, son muy escasos los estudios sobre patos domésticos en libertad, siendo la mayoría bien sobre otras especies de anátidas silvestres en libertad o bien sobre patos en explotación en granjas en régimen intensivo.

Los estudios en paseriformes se enmarcan, en general en distintos análisis multiespecie sobre la presencia de *C. psittaci*. Destacan por su número los estudios realizados en Holanda (Madani & Peighambari, 2013), que incluyen 32 paseriformes siendo 3 de ellas positivas; en Polonia, con 22 paseriformes, 5 de ellas positivas (Krawiec et al., 2015.), y en Suecia, con 312 paseriformes analizadas y 9 positivas a *C. psittaci* (Olsen et al., 1998), todas ellas detectadas por PCR.

### **1.5.3. Enterobacterias. Características generales**

Las enterobacterias pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, y son bacterias Gram negativas con más de 30 géneros y más de 100 especies. Son bacterias oxidasa negativo, anaerobios facultativos, catalasa positivos, no forman esporas y son quimioheterótrofas.

La mayoría de las especies se encuentran en el intestino del hombre y animales de forma natural como microbiota normal, y al ser expulsadas por heces suelen utilizarse como medidores epidemiológicos de higiene poblacional. Aunque su presencia es normal, y previene infecciones de otro tipo (Van Der Waaij, 1983.) puede determinar infecciones

normalmente en el tracto intestinal, provocando diarreas y deshidratación (Linton &Hinton 1988).

Sin embargo, existen otras enterobacterias que pueden considerarse patógenos primarios, como las pertenecientes a los géneros *Salmonella*, *Escherichia*, *Yersinia* y *Shigella* (Dekker &Frank, 2015).

Las bacterias del género *Salmonella* forman parte de la familia *Enterobacteriaceae*, perteneciente al orden *Enterobacteriales*. El género *Salmonella* comprende dos especies, *S. bogori* y *S. entérica*, siendo esta última la mayoría de las que coloniza el tracto digestivo y la más patógena.

Esta especie cuenta a su vez con seis subespecies; *entérica*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *indica* y *slamae*.

Por lo general, habitan el intestino de gran número de animales, y en éstos suelen comportarse como bacterias apatógenas. Sin embargo, pueden ser patógenos de gran importancia en salud pública, causando signos clínicos normalmente de carácter gastrointestinal, aunque en casos graves pueden causar enfermedad sistémica (Martín-Maldonado, 2021). Se trata de una infección intracelular facultativa, que cuando llega a la lámina propia del intestino produce una reacción inflamatoria con ulceración y por consiguiente un cuadro de diarrea. Los síntomas más comunes son fiebre alta, diarrea acuosa, náuseas y vómitos (Dekker & Frank, 2015), y en algunos casos puede complicarse con artritis reactiva, daños neurológicos y en algunas ocasiones la muerte (Ajene, 2013).

Los reservorios de *Salmonella sp.* incluyen casi todas las especies animales, siendo la mayoría portadores asintomáticos que excretan la bacteria por las heces. La transmisión, por tanto, se produce principalmente por vía oral-fecal. La transmisión de animal a humano puede ser vía oral-fecal, pero también puede ser indirecta a través de alimentos, cursando la enfermedad de forma semejante a la infección en animales. De hecho, es el segundo patógeno alimentario más frecuente en la UE, como se puede ver en la tabla 6.

	2022		2021		2020		2019		2018	
	Casos	Tasa								
<b>España</b>	8832	25,5	6168	17,8	3526	-	5087	-	8730	-
<b>UE</b>	65.208	15,3	60.169	15,3	52.690	12,1	78.189	18,0	82.392	18,2

**Tabla 6.-** Número de casos confirmados de salmonelosis en humanos y tasas de notificación (por 100.000 habitantes), en España y en la UE en el periodo 2018-2022. (EFSA Journal, 2023).

Dentro del género *Yersinia*, destacan dos especies patógenas: *Yersinia pestis*, causante de la peste bubónica, y *Yersinia enterocolitica*. La *Yersinia enterocolitica* es un cocobacilo gramnegativo, aerobio o anaerobio facultativo. Esta bacteria no forma esporas y presenta pili y fimbrias, estructuras que le permiten adherirse a las superficies y a otras células. Además, tiene una cápsula delgada y flagelos peritricos o anfitricos, lo que le permite moverse (Fredriksson-Ahomaa, 2019).

Se reproduce en las membranas mucosas y puede propagarse a través del contacto con animales, la ingestión de alimentos contaminados o agua infectada. Se encuentra en el intestino de animales domésticos (Donnenberg, 2000), incluyendo a las aves. Fue identificada por primera vez como un patógeno primario en seres humanos en 1939 y se le ha relacionado con problemas intestinales. De hecho, es conocida por ser una de las causas del síndrome diarreico invasivo, aunque es menos común que otros agentes patógenos. Afortunadamente, las infecciones mortales causadas por esta bacteria son raras. Puede dar lugar a una variedad de manifestaciones clínicas, que van desde un síndrome diarreico invasivo de duración limitada hasta casos graves de septicemia que pueden resultar en la muerte. Entre las manifestaciones más comunes se encuentra la adenitis mesentérica, que puede causar síntomas similares a los de una apendicitis, así como poliartritis, eritema nodoso, inflamación del extremo del intestino delgado

llamada ileítis terminal y necrosis hemorrágica en la zona del intestino conocida como ileocecal (Fredriksson-Ahomaa, 2019.; Gaston, 2003).

La yersiniosis es la tercera infección alimentaria en importancia en la UE como se puede ver en la tabla 7.

	2022		2021		2020		2019		2018	
	Casos	Tasa								
<b>España</b>	1162	2,7	754	1,7	296	-	409	-	549	-
<b>UE</b>	7919	2,2	7009	1,8	5737	1,7	6804	2,1	6817	2,1

**Tabla 7.-** Número de casos confirmados de yersiniosis en humanos y tasas de notificación (por 100.000 habitantes), en España y en la UE en el periodo 2018-2022. (EFSA Journal, 2023).

La *Escherichia coli* es una bacteria perteneciente a la familia de *Enterobacteriaceae*. Es la bacteria anaerobia facultativa comensal más abundante de la microbiota del tracto gastrointestinal. Se trata de un bacilo gramnegativo, oxidasa negativo, catalasa positivo, anaerobio facultativo, mesófilo, fimbriado y normalmente móvil por flagelos peritricos (Croxen et al., 2013).

Se distinguen varias cepas patogénicas dependiendo del factor genético que define su virulencia. Existen distintas clasificaciones para las infecciones de *E. coli*, destacando siete patotipos principales; *E. coli* enteropatógena (**EPEC**), *E. coli* enterotoxigénica (**ETEC**), *E. coli* enteroinvasiva (**EIEC**), *E. coli* enteroagregativa (**EAEC**), *E. coli* productora de toxina Shiga (**STEC**), *E. coli* de adherencia difusa (**ADEC**) y *E. coli* enterohemorrágica (**EHEC**) (Fratamico et al., 2016).

La *E. coli* diarrogénica (**DEC**) engloba dos de estos tipos (EPEC y STEC) y es una de las principales causas de diarrea humana. Se ha sugerido que las aves silvestres son reservorios potenciales de estos patógenos (Lopes et al., 2018). Las *E. coli* enteropatógenas (EPEC), producen una proteína denominada intimina (gen *eaeA*) para adherirse a las células intestinales, provocando la lesión de adhesión y borrado. Por otra

parte, dentro de las *E. coli* productoras de shigatoxinas (STEC), destacan aquellas cepas que producen el síndrome urémico hemolítico y la colitis hemorrágica en humanos (Garmendia et al., 2005; Garrido et al., 2006; Mora et al., 2009).

Epidemiológicamente, en su afectación a los humanos, las infecciones por *E. coli* STEC fueron la cuarta más reportada en el año 2022 en la Unión Europea, como se indica en la tabla 8, comparándola con los casos del año 2021:

	2022		2021		2020		2019		2018	
	Casos	Tasa								
<b>España</b>	623	1,3	422	0,9	74	-	269	-	126	-
<b>UE</b>	7117	2,1	6406	1,9	4489	1,5	6214	2,0	6327	2,2

**Tabla 8.-** Número de casos confirmados de *E. coli* STEC en humanos y tasas de notificación (por 100.000 habitantes), en España y en la UE en el periodo 2018-2022. (EFSA Journal, 2023).

Las bacterias del género *Shigella* son bacilos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Son bacterias gramnegativas, inmóviles, no forman esporas y son anaeróbicas facultativas. En los seres humanos, *Shigella* spp. causa disentería, caracterizándose por los siguientes síntomas diarrea, fiebre, náuseas, vómitos, pérdida de apetito, calambres estomacales y otras manifestaciones intestinales. Además, *Shigella* spp. ha sido identificada como una de las causas patógenas de la artritis reactiva a nivel global (Linton, 1988). Esta bacteria suele estar en el tracto digestivo de primates, no considerándose a otros mamíferos, y menos aún a las aves, como reservorios importantes.

Las bacterias pertenecientes al género *Klebsiella* son inmóviles, Gram negativas y anaerobias facultativas. Aunque se considera un patógeno oportunista, puede causar diferentes cuadros infecciosos en humanos, sobre todo neumonía, aunque también puede cursar con rinitis, infecciones del tracto urinario y digestivo (Podschn & Ullmann, 1998). Además, *K. pneumoniae* puede presentar un importante abanico de mecanismos de resistencia a antimicrobianos, muy especialmente las *K. pneumoniae* resistentes a

carbapenemasas (KPC), siendo un problema sanitario nosocomial emergente (Dong et al., 2022).

Respecto a las enterobacterias principales analizadas en este estudio, destacaremos las siguientes según los datos publicados hasta ahora.

#### 1.5.3.1.- *Salmonella spp en las especies de estudio*

No existen hasta la fecha detección positiva de *Salmonella* en las especies de cotorras seleccionadas. Empleando la PCR se analizaron dos cotorras en Brasil, una cotorra gris (Allgayer et al., 2008) y una de Kramer (Lopes et al., 2014) ambos con resultado negativo. En Italia, también se buscó mediante PCR (De Luca et al., 2018), en un ejemplar de cotorra gris y otro de Kramer, siendo negativos en ambos casos, igual que otro estudio en Irán, con detección por la misma en seis cotorras de Kramer cautivas, todas ellas negativas a *Salmonella* (Seifi et al., 2019). Por otra parte, en Chile se realizó serología en seis cotorras de Kramer y en dos grises, también con resultado negativo (Gonzalez, 2006).

Existen varios trabajos de detección en patos domésticos de *Salmonella*, entre los que destacan los realizados en Irán con 291 patos vivos de mercado (Jamali et al., 2014a), en el que se detecta un 28,8% de positivos. En Malasia, en 75 patos de granja detectaron un 16% de positivos a *Salmonella* (Faiza et al., 2013). Por último, en Taiwan, en 2400 muestras de patos de granja, se encontró una prevalencia de *Salmonella* del 3,8%. En todos estos estudios la detección se realizó mediante cultivo (Tsai & Hsiang, 2005). En una revisión sobre la presencia de *Salmonella* en patos domésticos, realizada en el año 2012, se plantea una prevalencia media del 19,9% (Adzitey et al., 2012).

Existen apenas estudios publicados de *Salmonella* en paseriformes. Uno de ellos, sobre 48 muestras de canarios se encontró un animal positivo (Beleza et al., 2019), y otro es en Croacia con un análisis global de 107 aves entre las que se encontraban 20 paseriformes, de las que dos fueron positivas a *Salmonella* (Vlahović et al., 2004), todas ellas por cultivo.

### 1.5.3.2.-*Escherichia coli* en las especies de estudio

Existen muy pocos artículos sobre la detección de *E. coli* diarroagénica (DEC) en cotorras grises y de Kramer. En 1978, Graham y Graham no encontraron la bacteria en las heces de siete cotorras grises empleando cultivo bacteriológico (Graham & Graham, 1978), y sobre cotorra de Kramer no se han encontrado referencias bibliográficas relativas a esta bacteria.

Sin embargo, en patos domésticos hay mucha más bibliografía disponible. La mayoría de los estudios, sin embargo, van dirigidos a la identificación de resistencias a antimicrobianos en *E. coli* (Thu. et al., 2019; Kim et al., 2016; Zhang, 2021.) o de factores de patogenicidad además de las toxinas shiga (Wang et al., 2010), como en la *E. coli* APEC (*E. coli* patógena aviar); y prácticamente no existe ninguna detección de *E. coli* EPEC.

Destaca únicamente un estudio en Alemania (Ewers, 2009) sobre muestras de heces de un río donde había gran abundancia de ánades reales. De 175 muestras, analizadas por PCR y Multilocus Sequence Typing (MLST), 142 fueron positivas a *E. coli*, siendo negativas todas a *stx-1* y *stx-2*, pero sí identificándose 30 ExPEC (*E. coli* patógena extraintestinal, capaz de provocar enfermedad fuera del tracto intestinal), de lo que concluyeron que esta especie, muy abundante en láminas de agua de ciudades, eran un reservorio importante de este tipo de *E. coli* zoonótica.

Por último, existen publicaciones donde se analizan distintas especies de paseriformes dentro de estudios más globales. Sólo hay un estudio únicamente de paseriformes, en Brasil mediante aislamiento y e identificación mediante pruebas bioquímicas en canarios de jaula. De 387 aves 25 de ellas fueron positivas (Horn et al., 2015); sin embargo, en este trabajo no se determinó el potencial patogénico de las cepas de *E. coli* aisladas.

Otros estudios más globales, como ya citado de Beleza (Beleza et al., 2019) en Brasil obtuvieron un 4,6% de prevalencia en 48 muestras. Dos de estas fueron identificadas como EPEC.

#### 1.5.3.3.-Otras enterobacterias

Existen pocos estudios específicos de otras enterobacterias como *Yersinia*, *Klebsiella* o *Shigella* en patos domésticos libres en contacto con el medio ambiente circundante y en aves paseriformes.

Sobre patos de mercado y aves de granja, podemos destacar los estudios en China sobre un total de 112 patos de granja, en los que se detectó un 4,46% de prevalencia de *Yersinia enterocolitica*. (Peng et al., 2018). De igual modo, en 291 muestras de ánades de mercados de Irán se observó un 2,4% de prevalencia de *Yersinia* sp. (Jamali et al., 2014b). En un estudio realizado en Polonia sobre aves libres, en este caso ánades reales, en 50 animales no se detectó ninguna de las enterobacterias mencionadas en este apartado (Odyniec et al., 2020). Todos estos trabajos se realizaron mediante cultivo e identificación mediante pruebas bioquímicas.

Sobre paseriformes destaca un trabajo en Suecia de detección de *Yersinia* sp. mediante aislamiento e identificación sobre varias especies de aves, entre ellos mirlos, papamoscas, estorninos y gorriones comunes. Solo hubo dos positivos en 43 mirlos (Niskanen et al., 2003). También en paseriformes destaca un estudio en Sicilia (Foti et al., 2011) de 239 de estas aves, aunque sin identificar especies, dando en total 9 positivos a *Klebsiella* y 8 a *Yersinia*, también empleando cultivo y bioquímica.

#### 1.5.4.-Influenza Aviar. Características generales

El virus de la Influenza Aviar forma parte del género *Alphainfluenzavirus* de la familia *Orthomyxoviridae*, y son virus ARN segmentados de cadena negativa, el cual se replica

mediante ARN polimerasa que no corrige los errores de lectura, produciendo una alta tasa de mutaciones. Los virus influenza se dividen en tres tipos (A, B y C) según las características antigénicas de dos de sus proteínas internas (M y NP), pero únicamente el tipo A es el que causa infección en aves.

Los virus de la gripe A se clasifican mediante los subtipos presentes en sus glicoproteínas de superficie, la hemaglutinina (H) y la neuraminidasa (N). En total, se han descrito 16 subtipos H y 9 N, lo que confiere un total de 144 posibles combinaciones de posibles subtipos, cada una con una susceptibilidad potencialmente diferente del huésped (Causey & Edwards, 2008). Estas combinaciones pueden dar lugar a variantes de baja, media y alta patogenicidad, siendo estas últimas las que causan mayores problemas tanto para la industria avícola como para otras especies, como el ser humano, donde puede llegar a ser una zoonosis de moderada a grave.

El principal reservorio del virus de la influenza aviar se encuentra en las aves acuáticas, donde se multiplican en el tracto gastrointestinal produciendo gran cantidad de viriones, generalmente sin producir ningún signo clínico (Alexander, n.d.; Heeney, 2006). La mayoría de las cepas son de baja patogenicidad en aves (Daszak et al., 2000; Swayne & Suarez, 2000), siendo asintomáticas en la mayoría de los animales y personas; sin embargo, ocasionalmente existen episodios de introducción de gripe aviar de alta patogenicidad, que pueden causar enfermedades graves y una alta mortalidad en todos sus huéspedes (Causey & Edwards, 2008). En estos casos, puede cursar con parálisis, depresión, deshidratación, bajada de peso, dificultad respiratoria y muerte sin síntomas previos (Swayne & Suarez, 2000).

Las infecciones en humanos ocurren cuando el virus ingresa por mucosas digestivas o por vía inhalatoria, y puede producir desde caso asintomáticos o leves hasta neumonías graves con alta mortalidad (Swayne & Suarez, 2000).

El virus de la gripe aviar de alta patogenicidad es de declaración obligatoria (RD526/204), y se define “como una infección de las aves causada por cualquier virus de influenza de tipo A perteneciente a los subtipos H5 o H7 o por cualquier virus de influenza de tipo A

con un índice de patogenicidad intravenosa (IPIV) superior a 1,2 o que cause mortalidad en al menos el 75% de los casos (AA. VV, 2023). Según este informe del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España, desde julio del 2022 hasta junio de 2023 han sido comunicados 923 focos en aves de corral, 3714 en aves silvestres y 314 en aves cautivas en Europa, dándose 128 focos en España.

La capacidad del virus para mutar de cepas de baja a alta patogenicidad, unida al gran número de virus circulantes, da un gran potencial zoonótico y que puede ser causante de grandes pandemias (Baigent & McCauley, 2003.; Heeney, 2006).

Con el fin de obtener un registro visual de la situación actual de la influenza aviar en Europa, en la figura 6 se muestran los casos reportados en 2023.

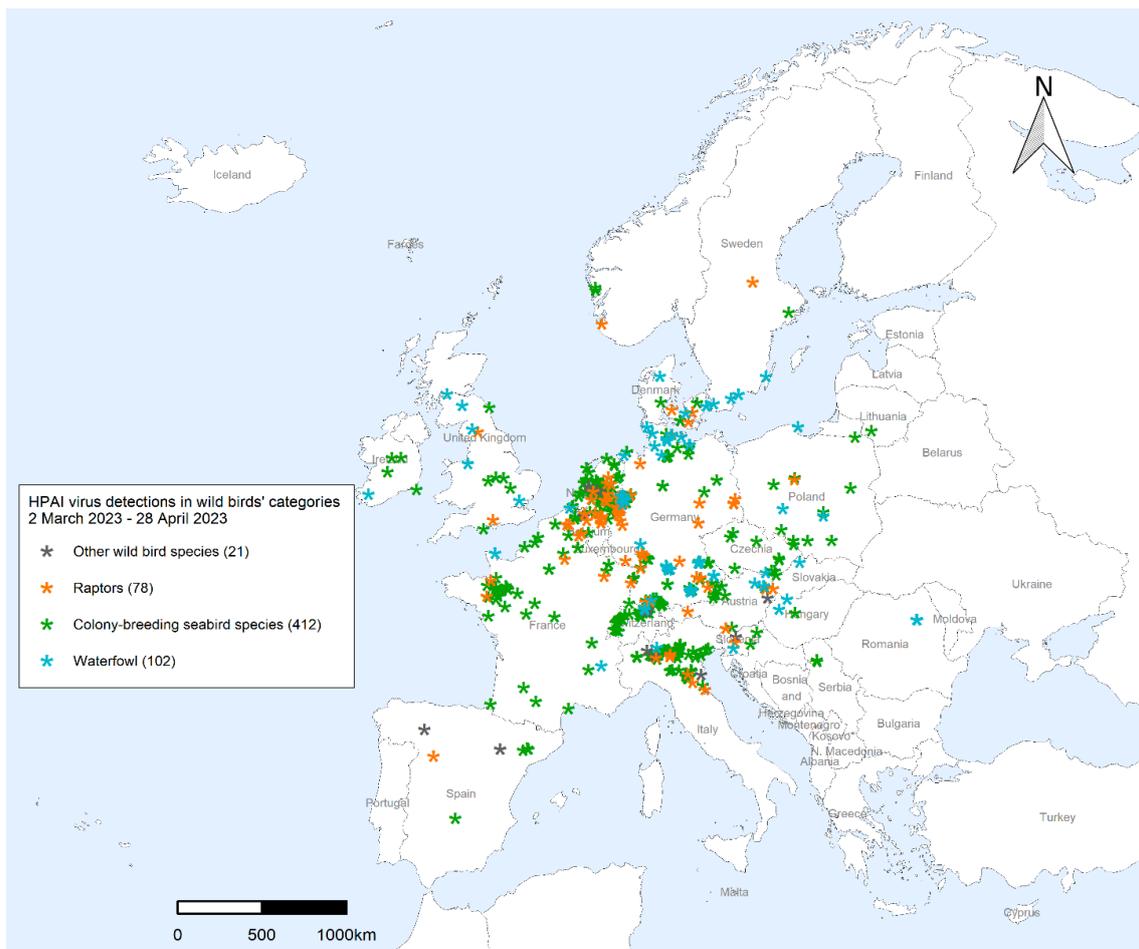


Figura 6.-Casos comunicados de influenza aviar en EU en el año 2023 (EFSA Journal, 2023).

En la actualidad se considera el riesgo sanitario más relevante desde el punto de vista de “salto de especie” de las aves silvestres a los seres humanos. Esto es todavía más grave en la pandemia actual de gripe aviar, donde se han reportado más de 40 especies de mamíferos susceptibles al virus (Plaza et al. 2024). Si bien, se conocen una multitud de especies reservorio y aquellas donde el salto de especie al humano puede darse con mayor facilidad, como veremos a continuación, existe un vacío importante en el conocimiento sobre el papel que otras especies aviares desempeñan en la epidemiología del virus.

#### *1.5.4.1.-Influenza Aviar en las especies de estudio*

La información sobre la Influenza Aviar en la cotorra gris argentina y la cotorra de Kramer es muy escasa. En cotorra gris, sólo un estudio evalúa la presencia de AIV empleando una prueba de hemaglutinación en un ave importada a Austria con resultado negativo (Stunzner et al., 1980). En cotorra de Kramer, se reportaron dos aves cautivas positivas para las cepas H9N2 durante un diagnóstico virológico de rutina en aves importadas a Japón (Mase et al., 2001).

A pesar de ser una de las enfermedades zoonóticas sobre la que se realiza más vigilancia, ésta va dirigida a aves de corral principalmente y al análisis de anátidas cazadas en distintos humedales, como en el programa de vigilancia de gripe aviar del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España (Programa de Vigilancia de la Influenza aviar en España 2024, 2023). Además, existen numerosos datos de detección en grandes brotes de mortandad y en animales sospechosos de enfermedad, principalmente en animales de producción. En consecuencia, no se incluyen en esta revisión, tanto por su extensión como por no tratarse de patos domésticos en semilibertad, principalmente procedentes de parques urbanos.

Muchos de los estudios sobre la influenza aviar en patos domésticos en régimen de semilibertad están realizados en China, debido a la importancia que tiene el mercado de patos en este país y en Asia en general. En este país, en un estudio con patos vivos que se venden en los mercados, se recogieron 111 hisopos orofaríngeos que se analizaron

por RT-PCR previa inoculación en embriones de pollo. Solo una muestra resultó positiva (0,9%) (Li et al., 2016). También en patos vivos de mercado, en Irán (Abtin et al., 2022), con 962 hisopos orofaríngeos recogidos se detectó el virus en el 0,5% de la muestra. En este caso también se inocularon en embriones, y se analizaron posteriormente con técnicas de inmunodifusión.

Es interesante por la comparación que se hace entre métodos de explotación el estudio realizado en Tailandia en un brote de mortalidad de patos domésticos (Songserm et al., 2006). Sobre un total de 450 patos enfermos o muertos, por técnicas de hemoaglutinación, se describió la ausencia del virus en patos mantenidos encerrados con medidas de bioseguridad, mientras que en los patos criados en patios traseros de casa la prevalencia fue del 23% y en patos en régimen de pastoreo en libertad fue la mayor, con un 45,9%.

En cuanto a paseriformes, en un estudio del 2010 en Estados Unidos, se realizó un monitoreo sobre más de 13000 muestras de aves de distintos órdenes por todo el país, entre las que estaban 152 especies de paseriformes con 4300 muestras. La prevalencia por RT-rtPCR en todo el país fue del 0,89%, por lo que, debido a la gran distribución de estas especies y su gran presencia en ciudades, propone que son un factor de contagio mayor que las aves acuáticas, consideradas reservorio natural de esta enfermedad (Fuller et al., 2010). Resultados similares se obtuvieron en Perú, donde se analizaron 202 paseriformes mediante RT-rtPCR encontrando esta vez 5 positivos (Williams et al., 2012).

Por el contrario, parece observarse una tendencia diferente en el continente europeo. Por ejemplo, en Francia (Lebarbenchon et al., 2010), se realizó un estudio con más de 2900 muestras, de las que aproximadamente un 30% de ellas eran paseriformes, y el resultado fue negativo para todas ellas. También en Europa, en Italia, en 83 muestras de paseriformes no hubo ninguna detección del virus, esta vez por serología (De Marco et al., 2003). El único estudio realizado en España es en Cataluña, sobre una muestra más amplia se analizó un fringílido, que resultó negativo por RT-rtPCR (Busquets et al., 2009).

### **1.5.5.-Virus de la enfermedad de Newcastle. Características generales**

El agente etiológico de la enfermedad de Newcastle es el Paramyxovirus aviar 1 (Yusoff & Wen Siang Tan, 2001). Dicho virus pertenece a la familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Paramyxovirinae*, género *Avulavirus*. Es un virus de ARN de cadena simple, y su presentación en animales puede ser de tres formas: lentogénica, mesogénica y velogénica o muy virulenta, siendo esta última variante la responsable de la presentación más grave de la enfermedad.

La enfermedad de Newcastle es una de las principales enfermedades en aves de granja, siendo la de mayor impacto en la economía global de los países endémicos de esta enfermedad, aunque en países con procesos de vacunación como los de la Unión Europea sufren brotes esporádicos de gran gravedad epidemiológica (Alexander, 2011).

La enfermedad en animales se puede transmitir por inhalación o ingestión del virus. Los signos clínicos varían, según la virulencia, y pueden ir desde asintomáticas hasta letargia, signos respiratorios y síntomas nerviosos (temblores, espasmos, tortícolis hasta parálisis completa), junto con diarrea y disminución o cese de producción de huevos. El patotipo velogénico puede provocar muerte súbita (Merck & Co., Inc. 2022). En el ser humano puede causar una conjuntivitis leve (Prajna et al., 2022), por lo que se debe de tratar como una zoonosis.

Es una enfermedad de declaración obligatoria (RD526/2014) excepto cuando se da en columbiformes y aves silvestres, y está establecido un plan de vacunación a nivel europeo. Desde el 13 de octubre de 2022 España tiene el estatus de país libre para la enfermedad según lo establecido en el código de la Organización Mundial de Sanidad Animal; si bien se sabe que este virus está circulando en aves silvestres, principalmente en palomas (Esperón et al., 2014).

#### 1.5.5.1.- *Virus de la Enfermedad de Newcastle en las especies de estudio*

Los estudios sobre NDV en las dos especies de cotorras seleccionadas para el estudio son pocos y la mayoría antiguos, realizados excepto el más reciente mediante estudios serológicos. En una tesis realizada en la India (Vijayan, 1981) sobre 103 cotorras de Kramer cautivas, 17 fueron seropositivas. Otros estudios centrados en *Psittacidae* mostraron resultados negativos para la detección de NDV (Gilardi et al., 1995; Johnson et al., 1985) con la excepción del estudio más reciente de prevalencia de NDV en la India, donde se encontraron dos positivos de cuatro Psitaciformes analizadas, aunque no determina de que especie se trataba (Bansal et al., 2022).

Si bien existen muchas descripciones de infecciones por el virus de la enfermedad de Newcastle en anátidas silvestres y domésticas, existen pocos estudios sobre vigilancia epidemiológica de dicho virus en el pato doméstico. Destaca el trabajo de Lee en 2009 sobre 8500 patos provenientes de granjas surcoreanas (Lee et al., 2009), donde mediante inoculación a embriones de pollos y posterior identificación por un kit comercial mediante RT-PCR, se detectaron 14 positivos, aunque no define el tipo de explotación.

Sobre la posible transmisión entre patos silvestres y de granja, destaca el estudio sobre 8439 muestras de aves de mercado y aves silvestres, aunque sin especificar el número de cada bloque, 14 animales fueron positivos por RT-rtPCR, 9 aves silvestres y 5 domésticos, apuntando a que hay contagios entre poblaciones silvestres y domésticas (Kim et al., 2012).

La mayoría de los estudios sobre el virus de la enfermedad de Newcastle en paseriformes son del siglo pasado y los más recientes se basan en la susceptibilidad de las paseriformes para el virus de Newcastle. Destaca un estudio de Silva en el 2006 en Brasil (Silva et al., 2006), donde se muestrean 103 gorriones capturados en granjas de patos y criaderos de pollos, obteniendo en estos últimos un 10,7% de prevalencia. El virus hallado mediante aislamiento en cultivo era del mismo tipo que la cepa vacunal del

criadero. Un estudio reciente en Irán analiza 37 paseriformes, resultando 13 positivos previa inoculación en embriones y posterior análisis por RT-PCR (Khalafi et al., 2023).

## **2.-JUSTIFICACIÓN**

Actualmente, 4400 millones de habitantes, el 56% de la población mundial, vive en ciudades, y se calcula que para el año 2050, 7 de cada 10 personas vivirán en ellas.

En España, según los cálculos del Centre d'Estudis Demogràfics el 33% de la población vivirá en Madrid o Barcelona. Esta dinámica de poblaciones conlleva que la mayoría de la población mundial vive y vivirá cada vez más en grandes ciudades, y esto deriva en que el contacto con animales, fuera de las mascotas, será con fauna urbana o periurbana, y, como hemos visto, este contacto será más estrecho donde los habitantes de la ciudad buscan disfrutar de la naturaleza, es decir en los parques urbanos.

Estos parques han cobrado importancia a lo largo de los años, siendo un factor muy importante en el diseño de las ciudades nuevas, remodelación, rediseño y ampliación de los que ya existen, e incluso la creación de nuevos parques en ciudades ya maduras, dando prioridad a estos espacios sobre la edificación de viviendas. Este es uno de los factores principales, como hemos visto, para la calidad de vida de los ciudadanos, viendo como han cobrado importancia como lugares de esparcimiento, ocio, para practicar deporte y sobre todo para estar en contacto con la naturaleza.

Así pues, dentro del concepto "One Health", la interacción entre la salud humana, la sanidad ambiental y la animal tendrá su máximo exponente en los grandes parques de las grandes ciudades, donde cobra pleno sentido este concepto de salud global que surge de la interacción de la salud humana con el entorno. Afirmada esta base, es imprescindible valorar el estado sanitario de la fauna urbana que habita estos grandes parques, ya que la posible transmisión de enfermedades de animales a hombres será mucho más probable en estos entornos urbanos que fuera de éstas, donde el contacto con fauna silvestre será prácticamente inexistente.

Esta vigilancia sobre la fauna y las posibles zoonosis que pueden generar es una labor ya rutinaria en el caso de animales de producción y domésticos, donde las campañas de saneamiento, diagnósticos y tratamientos veterinarios, se hace manera habitual por parte de los distintos organismos competentes. En cuanto a animales silvestres, la

práctica totalidad de la monitorización sanitaria se realiza en animales de espacios naturales como parte del plan de salud global, incluyendo su posible papel como reservorios de enfermedades de animales domésticos.

Fuera de esta vigilancia, no existe prácticamente ninguna sobre la fauna urbana en libertad, perdiendo de esta manera gran parte de la información que se necesita para establecer los parámetros de la salud pública, ignorando el entorno y los animales con los que la mayoría de la población está y estará en contacto.

Este será el primer estudio basado en el análisis de los más importantes patógenos únicamente en parques urbanos, intentando aportar así un parámetro principal para valorar la sanidad pública.

Además, el estudio ha pretendido ser ambicioso al englobar en las especies muestreadas la mayor representatividad en cuanto a la importancia dentro de las enfermedades a estudiar y su biología e interacción con otras especies y personas. Dentro de los parques urbanos, el mayor porcentaje de la fauna son aves, además de que casi son las únicas que entran en contacto con los visitantes de los parques.

Dentro de esta avifauna, se componen de tres grupos principales, que son la avifauna ornamental, que se introduce en los parques como colecciones, la avifauna autóctona y la exótica o invasora.

La avifauna ornamental, normalmente anátidas domésticas o de colección, viven en las superficies de agua de los grandes parques, donde reciben alimentación tanto del parque como del público visitante. Estas aves no tienen capacidad de vuelo, así residen todo el tiempo en un mismo lugar, pero en estos estanques se reciben visitas temporales de anátidas silvestres que descansan, se alimentan y a veces se reproducen en el mismo hábitat. Estas aves son migratorias, por lo que llegan con un estado sanitario diferente desde sus lugares de origen. Esto genera un papel de las anátidas domésticas de animales “centinela”, ya que al contacto con estas aves migratorias pueden contagiarse de los patógenos que lleven estas, permitiendo ver el estado sanitario de las aves de paso sin necesidad de analizarlas, permitiendo mantener protocolos de alerta temprana.

Dentro de la avifauna autóctona, también hay especies migratorias que pueden introducir enfermedades no existentes en el lugar de estudio o difundirlas a otros lugares en la migración, permitiendo también el monitoreo sobre estas aves.

Por último, la avifauna exótica, cada vez más presentes en los parques urbanos, puede traer consigo microorganismos exóticos, y tener un papel desconocido en la transmisión y dispersión de los endémicos.

En este estudio se ha elegido para el análisis, por lo tanto, un grupo de cada uno que sea representativo de la diversidad tanto biológica como sanitaria.

Por una parte, se ha seleccionado, de la fauna autóctona, las passeriformes, que como hemos visto, es grupo mayoritario dentro de estas aves, y que además tiene especies tanto migratorias como sedentarias, cubriendo ambos papeles.

Dentro de las aves ornamentales, el estudio se ha realizado sobre anátidas domésticas sin capacidad de vuelo, atendiendo sobre todo a su posible papel como especie centinela y a que son reservorios asintomáticos de enfermedades de gran potencial zoonótico, como la gripe aviar, y por último, dentro de las aves exóticas se ha elegido las psitácidas, y dentro de estas la cotorra gris y de Kramer, las especies con mayor población actualmente y con más interacción con otras especies tanto ornamentales como autóctonas.

## **3.-OBJETIVOS**

### **Objetivos generales**

-Conocer el estatus sanitario de la avifauna presente en los parques urbanos de grandes ciudades.

### **Objetivos secundarios**

-Demostrar la existencia de agentes infecciosos zoonóticos en especies invasoras como reservorio de expansión de las enfermedades

-Determinar si existen agentes infecciosos zoonóticos compartidos entre las diferentes especies que conviven en los parques

-Identificar diferencias de prevalencias entre las distintas especies analizadas.

## 4.-MATERIAL Y METODOS

### 4.1.- Estudio en cotorras

El estudio se engloba como parte de un proyecto de captura y control de la cotorra gris argentina (*Myopsitta monachus*) en el Ayuntamiento de Madrid y de cotorra de Kramer (*Psittacula krameri*) en el Ayuntamiento de Sevilla.

#### 4.1.1-Captura

En el Ayuntamiento de Madrid las capturas se realizaron en el periodo comprendido entre abril de 2016 y diciembre de 2017 en tres parques de la ciudad (figuras 7-9).



Figura 7.- Jardines del Campo del Moro



**Figura 8.-**Parque de la Cruz



**Figura 9.-**Parque del Oeste

Para ello se utilizaron modelos de reclamo en suelo (Parque de las Cruces, Campo del Moro) y dispositivos de trapeo en nido (Parque de las Cruces, Campo del Moro y Parque del Oeste) (figuras 10-12).



**Figura 10.-** Instalación de una trampa colectiva sobre un árbol. Los apoyos están recubiertos de goma para no dañar el tronco.



**Figura 11.-** Trampa para córvidos con reclamos en el compartimento central.



**Figura 12.-** Instalación de dispositivo de captura en nido.

La población de cotorra argentina en cada parque se obtuvo de estudios previos a la captura (López et al., 2016<sup>a</sup>, 2016c, 2016b) (tabla 9). Se analizaron 7 ejemplares/parque, que representaron porcentajes de alrededor del 2% en cada uno de los parques.

Parque	N	Nº capturados	Nº analizado/% N
Campo del Moro	340-385	32	7/1,81-2,05%
Parque de las Cruces	298-337	76	7/2,07-2,34%
Parque del Oeste	385-413	42	7/1,69-1,81%

**Tabla 9.-** Datos de captura y análisis de cotorra gris argentina en el Ayuntamiento de Madrid

En el Ayuntamiento de Sevilla el trabajo se realizó entre noviembre de 2019 y febrero de 2020 en el Parque de María Luisa (Figura 13). La población de cotorra de Kramer se obtuvo de estudios previos (López et al., 2019) y para la captura se utilizaron dispositivos de trapeo en nido y en suelo (modelo de tejado invertido, de techo corredero, de córvido y de revólver). (Tabla 10; figuras 14-15).



Figura 13.-Parque de María Luisa



Figura 14.- Trampa de tejado invertido



Figura 15.-Trampa de revólver

Parque	N	Nº capturados	Nº analizado/% N
Parque de María Luisa	1798	88	60/3,33%

Tabla 10.- Datos de captura y análisis de cotorra de Kramer en el Ayuntamiento de Sevilla.

#### 4.1.2.-Toma de muestras y selección de agentes patógenos

En cada individuo se tomó un enema cloacal. Básicamente, consta en la introducción por la cloaca de una pipeta Pasteur estéril con tampón fosfato salino (PBS). El PBS obtenido después de la aspiración se guardaba en tubos de 15 ml y era mantenido en refrigeración hasta posterior análisis.

Se seleccionaron los siguientes patógenos en cada grupo de captura. La selección de los mismos fue en base al presupuesto disponible (Tabla 11).

Agente	Madrid ( <i>Myopsitta monachus</i> )			Sevilla ( <i>Psittacula krameri</i> )
	Campo del Moro	P. de las Cruces	P. del Oeste	P. de María Luisa
C. psittaci	x	x	x	x
C.jejuni	X	x	x	x
Y. enterocolitica	x	x	x	
Salmonella spp	x	x	x	
Otras enterobacterias	x	x	x	
E. Coli zoonóticas	x	x	x	x
Salmonella Enteriditis				x
Influenza Aviar				x
Newcastle				x

**Tabla 11.-** Agentes patógenos analizados en cada parque y especie.

Debido a que la mayoría de los métodos empleados para la detección de patógenos son comunes en los distintos estudios de la presente tesis, éstos se detallarán en el apartado común de análisis laboratorial.

#### 4.2.- Estudio en patos

El estudio se engloba como parte de un control veterinario de zoonosis y enfermedades emergentes en los Jardines del Buen Retiro (Madrid) (Figura 16) realizado a lo largo de 11 años, desde el 2008 hasta el 2020, con interrupción de los análisis en 2012 y 2013.

El estudio se ha realizado mediante dos muestras anuales, una en el periodo de verano y otra en el periodo de otoño/invierno. En 2009 y 2010 se capturaron también ejemplares en el parque de Juan Carlos I en Madrid (figura 17).



**Figura 16.-**Jardines del Buen Retiro



**Figura 17.-**Parque Juan Carlos I

### 4.2.1.-Captura

En cada muestreo se capturan una media de 10 patos híbridos adultos de distintos estanques de los Jardines del Buen Retiro, mediante sacaderas, y redes en tierra (Tabla 12).

Año	Estación	Especie	Parque	Nº
2008	Verano	<i>Anas sp.</i>	Retiro	10
2009	Verano		Retiro	10
	Verano		Juan Carlos I	8
2010	Verano		Juan Carlos I	9
	Invierno		Retiro	9
2011	Verano		Retiro	12
2014	Verano		Retiro	10
	Invierno		Retiro	9
2015	Verano		Retiro	9
	Invierno		Retiro	10
2016	Verano		Retiro	10
	Invierno		Retiro	10
2017	Invierno		Retiro	10
2018	Verano		Retiro	10
	Invierno		Retiro	10
2019	Verano		Retiro	10
	Invierno		Retiro	10
2020	Verano		Retiro	10
	Invierno		Retiro	11
<b>Total Verano</b>			108	
<b>Total Invierno</b>			79	
<b>TOTAL</b>			187	

**Tabla 12.**-Datos de captura y análisis del Ayuntamiento de Madrid

#### 4.2.2.-Toma de muestras y selección de agentes patógenos

La toma de muestra fue mediante enema cloacal, tal como figura en el apartado 3.1.2.

Se seleccionaron los patógenos en cada año de estudio, como figura en la Tabla 13.

Agente	AÑO										
	2008	2009	2010	2011	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020
<i>C. psittaci</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>C.jejuni</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Y. enterocolitica</i>								X	X	X	X
<i>Salmonella spp</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Otras enterobacterias	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>E. Coli</i> zoonóticas	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Salmonella Enteriditis</i>	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Influenza Aviar	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Newcastle	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Tabla 13.-Agentes seleccionados en el estudio de patos.

#### 4.3.- Estudio en paseriformes

El estudio se realizó para el Ayuntamiento de Madrid para conocer el estado sanitario de las aves del orden paseriformes en los parques de la ciudad. Se capturaron aleatoriamente 63 aves pertenecientes a 17 especies, procedentes del Parque Juan Carlos I y Madrid Río de Madrid a lo largo de septiembre de 2019 (figuras 17 y 18; Tabla 14).



**Figura 18.-**Madrid Río.

### ***4.3.1.-Captura***

La captura se realizó con redes japonesas por anilladores oficiales (Figura 19).



**Figura 19.-**Red japonesa con pájaros capturados.

Las especies capturadas en cada parque figuran en la Tabla 14.

Especie	Juan Carlos I	Madrid Río	Total
Agateador común	1	0	1
Carbonero común	1	1	2
Curruca cabecinegra	3	1	4
Curruca capirotada	4	2	6
Curruca tomillera	1	0	1
Estornino común	0	1	1
Gorrión común	3	0	3
Gorrión molinero	0	10	10
Herrerillo común	0	7	7
Lavandera blanca	1	0	1
Lavandera cascadeña	1	0	1
Mirlo común	0	2	2
Mosquitero musical	1	5	6
Papamoscas cerrojillo	5	8	13
Petirrojo europeo	0	1	1
Pinzón vulgar	3	0	3
Pito real	0	1	1
<b>Total general</b>	<b>24</b>	<b>39</b>	<b>63</b>

**Tabla 14.-** Especies analizadas, número y lugar de origen.

### 4.3.2.-Toma de muestras y selección de agentes patógenos

La toma de muestra fue mediante enema cloacal e hisopo conjuntival. Los patógenos seleccionados figuran en la Tabla 15.

<i>Muestra</i>	<i>Agente</i>
Enema cloacal	<i>Chlamydophila psittaci</i>
	<i>Salmonella</i> spp.
	<i>E. coli</i> patogénicas aviares (APEC).
	<i>E. coli</i> zoonóticas
	Otras enterobacterias
	<i>Campylobacter jejuni</i>
	<i>Listeria monocytogenes</i>
	Influenza aviar
	Enfermedad de Newcastle (NDV).
Hisopo conjuntival	<i>Mycoplasma gallisepticum</i>

Tabla 15.- Muestras y agentes seleccionados.

### 4.4.-Pruebas laboratoriales

Como se ha mencionado anteriormente, la mayor parte de los métodos laboratoriales empleados a lo largo de la tesis fueron comunes. Para simplificar la redacción hemos dividido los métodos en dos grandes grupos: métodos moleculares y cultivos bacteriológicos.

## **4.4.1. MÉTODOS MOLECULARES**

### **4.4.1.1. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

Con el fin de obtener una mayor optimización de las muestras, se realizó la extracción simultánea del ARN y del ADN, empleando el método de filtración por presión (Quickgene DNA extraction kit, Fujifilm), con un paso adicional de ARN carrier después de la fase de lisado. Los ácidos nucleicos una vez extraídos se conservaron a -80°C hasta posterior análisis.

### **4.4.1.2. DETECCIÓN DE PATÓGENOS POR MÉTODOS MOLECULARES**

En la Tabla 16 se indican los cebadores utilizados para cada patógeno.

#### **4.4.1.2.1.- CHLAMYDOPHILA PSITTACI**

Se realizó la detección de *Chlamydomphila psittaci* en muestras de enema cloacal. El método elegido fue una rtPCR con sonda Taqman (Ménard et al., 2006). En el caso de obtener alguna muestra positiva, esta se genotiparía mediante rtPCR con curva de disociación de alta resolución (HRM) (Mitchell et al., 2009). La confirmación e identificación del genotipo se realizaría mediante la secuenciación de los productos amplificados a esta PCR.

#### **4.4.1.2.2.- CAMPYLOBACTER JEJUNI**

Se realizó la detección simultánea de *Campylobacter jejuni* en muestras de enema cloacal de rtPCR con sonda Taqman en formato dúplex (Van Lint et al., 2015).

#### **4.4.1.2.3.- VIRUS DE LA INFLUENZA AVIAR**

El análisis del virus de la Influenza Aviar se llevó a cabo a partir del enema cloacal. Para la detección de influenza aviar se empleó una RT-rtPCR basada en sonda TaqMan (Spackman et al., 2002).

#### **4.4.1.2.4.- VIRUS DE LA ENFERMEDAD DE NEWCASTLE**

Se partió de enema cloacal para el análisis del virus de la Enfermedad de Newcastle. La detección del virus de la enfermedad de Newcastle se basó en una RT-rtPCR a tiempo real mediante sonda TaqMan (Wise et al., 2004).

Agente	Método	Cebadores	Temperatura de alineamiento (°C)	Referencia
AIV	RT-rtPCR (TaqMan)	5'-AGATGAGTCTTCTAACCGAGGTCG-3' 5'-TGCAAAAACATCTTCAAGTCTCTG-3' 5'-(6FAM)TCAGGCCCCCTCAAAGCCGA-BHQ1-3'	60	(Spackman et al., 2002b)
<i>C. jejuni</i>	rtPCR (TaqMan)	5'-CTGGTGGTTTTGAAGCAAAGATT-3' 5'-CAATACCAGTGTCTAAAGTGCCTTAT-3' 5'-(6FAM)AATCCAACATCGCTAATG-MGB-3'	60	(Best et al., 2003)
<i>C. psittaci</i> (detección)	rt PCR (TaqMan)	5'-GCCATCATGCTTGTTCGTTT-3' 5'-CGGCGTGCCACTTGAGA-3' 5'-(6FAM)TCATTGTCATTATGGTGATTGAGGA-MGB-3'	60	(Ménard et al., 2006)
<i>C. psittaci</i> (genotipado) <sup>a</sup>	rt PCR (HRM-Eva Green)	5'-TGTGCAACTTTAGGAGCTGAGTTC-3' 5'-GCTCTTGACCAGTTTACGCCAATA-3'	60	(Mitchell et al., 2009)
<i>E. coli</i> ( <i>eaeA</i> )	PCR	5'-TCAATGCAGTTCGGTTATCAGTT-3' 5'-GTAAAGTCCGTTACCCCAACCTG-3'	55	(Vidal et al., 2004)
<i>E. coli</i> ( <i>stx-1</i> ) <sup>b</sup>	rt PCR (Sybr Green)	5'-CATTACAGACTATTTTCATCAGGAGGTA-3' 5'-TCGTTCAACAATAAGCCGTAGATTA-3'	55	(Chui et al., 2010)
<i>E. coli</i> ( <i>stx-2</i> ) <sup>b</sup>	PCR	5'-CTTCGGTATCCTATTCCCGG-3' 5'-CTGCTGTGACAGTGACAAAACGC-3'	55	(Vidal et al., 2004)
NDV	RT-rtPCR (TaqMan)	5'-AGTGATGTGCTCGGACCTTC-3' 5'-CCTGAGGAGAGGCATTTGCTA-3' 5'-(6FAM)TTCTCTAGCAGTGGGACAGCCTGC-BHQ1-3'	60	(Wise et al., 2004)
<i>Salmonella</i> spp.	rtPCR (TaqMan probe)	5'-GTGAAATTATCGCCACGTTCCGGGCAA-3' 5'-TCATCGCACCGTCAAAGGAACC-3' 5'-(6FAM)CTCTGGATGGTATGCCCGGTAAACA-BHQ1-3'	60	(Malorny et al., 2007)

**Tabla 16.-** Cebadores empleados para cada agente

(a) Solo se aplica a muestras positivas para la detección de *C. psittaci*.

(b) Solo se aplica en muestras positivas para la detección de *eaeA*.

#### **4.4.2. CULTIVOS BACTERIOLÓGICOS**

Los cultivos bacteriológicos se emplearon para identificación y caracterización de enterobacterias, incluyendo *Salmonella* spp. Brevemente, los pasos realizados fueron cinco: 1- enriquecimiento; 2- cultivo de *Salmonella* spp.; 3- cultivo del resto de enterobacterias; 4- identificación bacteriana; 5- identificación de factores de patogenicidad de *E. coli*.

##### **4.4.2.1. - PREENRIQUECIMIENTO**

Un tercio del material recogido en el lavado intestinal se empleó para la detección de *Salmonella* y otras enterobacterias. Se realizó una dilución 1/10 en agua de peptona, y se incubó 24 horas a 37°C.

##### **4.4.2.2. - CULTIVO DE SALMONELLA SPP**

Para el aislamiento selectivo de *Salmonella* spp., se inoculó una alícuota del caldo de peptona previamente incubado en medio verde brillante. Pasadas 24 horas, las colonias de color rojo o rosa son presuntivas de pertenecer al género *Salmonella*, y se seleccionan para su identificación.

##### **4.4.2.3. - CULTIVO DEL RESTO DE ENTEROBACTERIAS**

Otra parte del líquido de peptona se resembró en medio selectivo de enterobacterias (VRBG). Se seleccionaron para su identificación todas las colonias que presentaran diferentes características morfológicas.

#### 4.4.2.4.- IDENTIFICACIÓN BACTERIANA POR MÉTODOS MOLECULARES

La extracción del ADN bacteriano se realizó mediante la técnica por calor, que se basa, brevemente, en calentar una suspensión bacteriana a 100°C durante 5', enfriar a 4°C inmediatamente, y centrifugar para quedarse con el sobrenadante.

En el caso de las colonias de apariencia compatible con *Salmonella* spp., con el ADN extraído se realizó una rtPCR empleando sonda TaqMan que amplifica una parcialmente el gen *invA*, para su confirmación (Malorny et al., 2007).

Para el resto de las enterobacterias, la identificación se realizó mediante la amplificación parcial del gen ARNr16S (Jiang et al., 2013), mediante rtPCR con Sybr Green, y posterior secuenciación. Con el fin de mejorar la robustez en la clasificación se compararon las secuencias tanto con el Genbank como con la base de datos especializada en identificación bacteriana, leBIBIQBPP (Flandrois et al, 2015).

#### 4.4.2.5.- DETECCIÓN DE E. COLI ZONÓTICAS

Aquellas bacterias identificadas como *E. coli* se sometieron a la detección de genes de patogenicidad, siguiendo el protocolo descrito en nuestro grupo (Sacristán et al., 2014). Brevemente, en primer lugar, se detecta el gen de la intimina (*eaeA*) mediante PCR (Vidal et al., 2004), y en caso positivo, se consideraría zoonótica. Las cepas positivas a la intimina se someterían posteriormente a la detección de los genes *stx-1* (Chui et al., 2010) y *stx-2* (Blanco et al., 2003). Estos últimos análisis servirían para clasificarlo en cepas enterotoxigénicas (STEC) o en enteropatógenas (EPEC) (Sacristán et al., 2014).

Es importante resaltar que, durante el muestreo en cotorra de Kramer, debido al confinamiento por el SARS-COV-2, no se realizó cultivo bacteriológico. Sin embargo, sí se detectó de forma directa, mediante rtPCR tanto el gen *invA* para la búsqueda de *Salmonella* spp., como de las *E. coli* zoonóticas. Para esta última, el protocolo que se

realizó fue exactamente el mismo que figura en este apartado, con la salvedad de que la muestra de partida no eran colonias bacterianas, sino el ADN extraído del enema cloacal.

#### **4.5.-Estudio estadístico**

La finalidad del estudio estadístico era observar si existen diferentes proporciones de positivos para cada patógeno entre especies (estudio cotorras), épocas del año (estudio anátidas), comportamiento (estudio paseriformes) o condición corporal (estudio anátidas). Se seleccionaron las variables: especie de cotorra (cotorra de pecho gris/cotorra de Kramer; estudio de cotorras), estación (verano/otoño-invierno; estudio anátidas); comportamiento (migratorio/ no migratorio), condición corporal (inferior o igual a dos/superior a dos; estudio anátidas), y se les contrasta frente a los porcentajes de positivos obtenidos para cada patógeno, En primer lugar se realizó una prueba de normalidad (Shapiro-Wilk), con el fin de saber si el conjunto de muestras se adaptaba a una distribución normal.

Debido a la distribución no normal obtenida en los tres estudios, se aplicaron pruebas no paramétricas (prueba U de Mann-Whitney) en los tres estudios. Las pruebas se realizaron mediante el software IBM SPSS Statistics, versión 29.

## **5.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **5.1.-Cotorras**

#### **5.1.1-Resultados en cotorras**

En la Tabla 17 se resumen los resultados del estudio sanitario en las dos especies de cotorras. En total, se incluyeron 81 aves en el estudio: 21 cotorras grises argentinas y 60 cotorras de Kramer. Entre las cotorras grises, el 23,8% resultó positivo para *C. psittaci*

(5/21; IC 95% 5,6-42,0%). Los resultados de la secuenciación parcial del gen *ompA* revelaron que las muestras positivas podían clasificarse como genotipos B, E o E/B. No se detectaron cotorras de Kramer positivas a la detección molecular de *C. psittaci*, siendo la diferencia observada con la cotorra argentina estadísticamente significativa ( $p < 0,001$ ).

Los virus de influenza aviar (AIV) y el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV) sólo se detectaron en cotorras de Kramer: el 13,3% fue positivo para AIV (8/60; IC 95% 4,7-21,9%), y el 3,3% para NDV (2/60; IC 95% 0,0-7,9%).

En cuanto a la presencia de *E. coli*, el 9,5% de las cotorras grises dio positivo para el gen intimina (*eaeA*) (2/21; IC 95% 0,0-22,1%), mientras que la prevalencia de este gen en las cotorras de Kramer fue ligeramente mayor, alcanzando el 15% (9/60; IC 95% 6,0-24,0%). En las muestras positivas al gen *eaeA* se buscaron adicionalmente los genes *stx-1* y *stx-2* con el fin de identificar cepas enterohemorrágicas (EPEC). Todas las muestras fueron negativas para *Campylobacter jejuni* y *Salmonella spp.*

Durante la exploración, ninguno de los animales mostró signos clínicos compatibles con estos patógenos, por lo que se consideró que los individuos positivos eran portadores asintomáticos.

Agente infeccioso	<i>Myopsitta monachus</i>	<i>Psittacula krameri</i>
AIV	0	8 (13.3%;95%CI: 4.7-22.0%)
<i>Chlamydophila psittaci</i>	5 (23.8%; 95%CI: 5.6-42.0%)	0
<i>Campylobacter jejuni</i>	0	0
EPEC	2 (9.5%; 95%CI: 0.0-22.1%)	9 (15.0%;95%CI: 6.0-24.0%)
NDV	0	2 (3.3%;95%CI: 0.0-7.9%)
<i>Salmonella spp.</i>	0	0

**Tabla 17.-.** Positivos y prevalencia de cada agente infeccioso en las dos especies de psitácidas.

### 5.1.2-Discusión

Este estudio es el más completo realizado hasta la fecha en cuanto a número de muestras y patógenos analizados en ambas especies de cotorra en vida libre.

Destaca la detección por primera vez de *Chlamydia psittaci* en poblaciones libres de cotorras invasoras. La prevalencia de *C. psittaci* detectada en las cotorras argentinas, del 23,8%, es similar a otros estudios anteriores en individuos cautivos de la misma especie (Origlia et al., 2016), del 31%. Sin embargo, la comparación no tiene validez al ser animales cautivos y con signos de enfermedad en este último caso, lo que conllevaría una mayor prevalencia al tratarse de muestreos dirigidos. En contraste con nuestros resultados en cotorras de Kramer, que fueron negativos, *Chlamydia spp.* fue descrito en esta especie en estudios previos con prevalencias diferentes, desde el 5 al 20%, pero la mayoría de esos estudios no utilizó una PCR específica para la detección de *C. psittaci* (Chahota et al., 1997; Pisanu et al., 2018), con lo que los resultados no son comparables con los nuestros. Por último, en la bibliografía existe un estudio en cotorras de Kramer en el que se detecta una prevalencia mediante PCR del 20%; sin embargo, por desgracia, no se indica el origen de estos animales (Madani & Peighambari, 2013). También se menciona que algunas de las muestras se toman de animales muertos, pero tampoco se indica cuántos son y cuáles fueron positivos.

Entre los genotipos de *Chlamydia* descritos en aves, todos los autores coinciden en que el genotipo A es el más prevalente en *Psittacidae* (Sutherland et al., 2019; Vanrompay et al., 1993), mientras que los genotipos B, E y E/B son más comunes en palomas (Andersen, 1991; Sachse et al., 2015; Stokes et al., 2021). Hasta dónde llega nuestro conocimiento, este es el primer genotipado de *C. psittaci* en cotorras grises a nivel mundial. La presencia de los genotipos B, E o E/B en estas aves sugiere que las bacterias han sido transmitidas de palomas a cotorras en la dirección opuesta a la esperada. La presencia de *C. psittaci* en cotorras grises y la ausencia en las de Kramer podrían deberse al comportamiento alimentario de cada especie y, por lo tanto, sus interacciones con otras especies. Mientras que las cotorras grises se alimentan principalmente en el suelo (Postigo et al., 2021), las de Kramer lo hacen con mayor frecuencia en los árboles (Fratlicelli, 2014). Al

alimentarse en el suelo, las cotorras grises tienen la oportunidad de interactuar con palomas silvestres y luego compartir patógenos con ellas, principalmente los respiratorios. *C. psittaci* es altamente prevalente en palomas de Madrid (Vázquez et al., 2010), lo que magnifica la transmisión entre las palomas y las cotorras grises.

Prosiguiendo con la detección de bacterias, la detección de *Campylobacter jejuni* se ha llevado a cabo en cotorras grises o de Kramer (Allgayer et al., 2008; De Luca et al., 2018; Gonzalez, 2006; Lopes et al., 2014) y nuestros resultados negativos concuerdan con los publicados anteriormente para ambas especies. Sin embargo, un estudio realizado en cotorras de Kramer obtuvo un 67% de muestras positivas a *Campylobacter spp.* mediante detección por PCR (Seifi et al., 2019). Sin embargo, esta prevalencia proviene de una muestra muy pequeña (seis individuos) y en cautividad, lo que hace más probable un contagio mayor entre ellas. Además, al no ser una técnica específica para *C. jejuni*, la positividad en estas muestras podría deberse a la presencia de otras especies del género *Campylobacter*.

En lo referente a las enterobacterias, nuestros resultados de *Escherichia coli* mostraron que el 9,5% de las cotorras grises y el 15% de las cotorras de Kramer dieron positivo a *E. coli* diarreagénica (DEC), siendo todas catalogadas como *E. coli* enteropatogénica (EPEC). Esta representa la primera descripción de EPEC en estas especies de psitácidos. La *E. coli* diarreagénica (DEC) es una de las principales causas de la diarrea humana y las aves silvestres se han sugerido como reservorios potenciales para estos patógenos (Lopes et al., 2018). Sin embargo, como se ha mencionado en la introducción, este agente infeccioso no se ha buscado apenas en psitácidas. De hecho, en el único estudio publicado en cotorras grises y de Kramer, realizado en 1978, no detectaron *E. coli* en las heces de siete cotorras grises cautivas por cultivo bacteriológico (Graham & Graham, 1978).

En cuanto a *Salmonella spp.*, todas las muestras han sido negativas a la detección por PCR a tiempo real. Estos resultados concuerdan con otros estudios tanto con detección por PCR (Allgayer et al., 2008, Lopes et al., 2014, Seifi et al., 2019) como por serología

(Gonzalez, 2006), aunque cabe destacar el bajo número de muestras (seis como máximo) de todos estos análisis.

En cuanto a los virus detectados, la información disponible sobre la influenza aviar en cotorra gris argentina y cotorra de Kramer es escasa. El presente estudio es el primero realizado en aves urbanas de vida libre, y destaca la presencia de influenza aviar en el 13,3% de las cotorras de Kramer. En cotorra gris la detección fue negativa. Solo hay un estudio que evaluó la presencia de AIV por ensayo de hemaglutinación en una cotorra negra importada a Austria con resultado negativo (Stunzner et al., 1980). Sin embargo, en cotorra de Kramer, dos aves cautivas positivas para las cepas H9N2 se informaron durante diagnóstico virológico de rutina de las aves importadas a Japón. Hay que destacar que en los dos casos las aves eran cautivas, y en el caso de las cotorras de Kramer no indica el tamaño de muestra, por lo que no podemos compararlo con nuestros resultados.

En cuanto a la variante hallada, en nuestro estudio los ensayos para la identificación de AIV altamente patógeno (es decir, variantes H5 o H7) no se pudo intentar debido a la cantidad limitada de muestra.

Finalmente, el presente estudio confirma la presencia del virus de la NDV en dos cotorras de Kramer. Desafortunadamente, la identificación de cepas velogénicas no se pudo intentar por falta de muestra. Como ya se ha mencionado en la introducción, la literatura sobre NDV en cotorra gris y de Kramer es antigua y los estudios se realizaron mediante ensayos serológicos; por lo tanto, las muestras positivas solo confirmaron el contacto de los animales con el virus (Vijayan, 1981). Otros estudios centrados en otras especies de la familia *Psittacidae* mostraron resultados negativos para la detección de NDV (Gilardi et al., 1995; Johnson et al., 1985), con la excepción del estudio de prevalencia de NDV en India (Bansal et al., 2022), donde encontraron dos muestras positivas de cuatro *Psittaciformes* analizados. Desafortunadamente, no se disponía de datos sobre qué especies se analizaron, por lo que no podemos comparar los resultados.

Ambos AIV y NDV son de notificación obligatoria en avicultura debido a sus graves y repercusiones en la salud, y las aves silvestres, como las palomas salvajes o patos híbridos (*Anas spp.*), se consideran reservorios de ambos virus (Vázquez et al., 2010). Gracias a este estudio, se confirma la presencia de estos virus en cotorra de Kramer, lo que abre la posibilidad de la inclusión de esta especie en futuras campañas de vigilancia epidemiológica.

## **5.2.-Anátidas**

### **5.2.1-Resultados en anátidas**

En las tablas 18-20 se resumen los patógenos detectados en anátidas. En total, se incluyeron a lo largo de 11 años 177 muestras de patos domésticos. Cuatro animales analizados dieron positivo a *Salmonella sp.*, en años muy espaciados (2009, 2016 y 2020) con un total de 2,3% de positivos (IC95%: 0,1-4,5%), mientras que la detección de *Chamydophila* fue de un 1,1% (IC95%: 0-2,7%), con positivos solo en dos años. En uno de los casos se secuenció el genotipo, resultando indistintamente el E o E/B. Este genotipo es propio de palomas. En cuanto al virus de la Influenza aviar, se detectaron 4 positivos en total, con un porcentaje del 2,3% (IC95%: 0,1-4,5%). Estas muestras positivas fueron negativas a la detección de las variantes H7 y H5, por lo que se pueden considerar de baja patogenicidad.

Hay que destacar el porcentaje hallado de Enfermedad de Newcastle, de un 10,1% (IC95%: 5,7-14,6%), resultando el verano del año 2016 positivas todas las aves muestreadas. El porcentaje más alto se halla en la detección de *C. jejuni*, con 23 animales positivos (13%; IC95%: 8-17,9%), y el menor porcentaje se encuentra en *Y. enterocolitica* con un 0,6% de positivos, aunque esta prueba se empezó a realizar más tarde (a partir de 2016).

Además de *Yersinia enterocolitica*, se detectaron un total de 8 taxones diferentes de enterobacterias (*Atlantibacter hermannii*, *Citrobacter* sp., *Escherichia coli*; *Enterobacter* sp., *Klebsiella* sp., *Kluyvera* sp., *Proteus* sp. y *Serratia marcescens*) y otros cinco taxones relacionados ( $\beta$ -Proteobacteria: *Ralstonia solanacearum* y otras  $\gamma$ -Proteobacterias como *Acinetobacter* sp., *Pantoea agglomerans*, *Providencia alcalifaciens* y *Shewanella* sp.). De todas ellas, destaca la presencia elevada de *E. coli* (65,5% IC95%: 58,5-72,5%); sin embargo, tan solo una muestra fue positiva a la detección del gen *eaeA* (0,6%; IC95%: 0-1,7%). Esta muestra fue negativa a la detección de los genes *stx-1* y *stx-2*, por lo que se clasificó como *E. coli* enteropatógena (EPEC). Las siguientes bacterias más frecuentes fueron *Enterobacter* sp. (17% IC95%: 11,4-22,5%) y *Klebsiella* sp. (14,1%; IC95%: 9,0-19,3%). El resto de los aislados presentaron una frecuencia inferior al 10%.

En cuanto a la comparación entre épocas del año, destaca la mayor positividad a *Klebsiella* sp., en verano, con respecto a otoño/invierno (verano: 19%; otoño/invierno: 7,8%;  $p=0,034$ ). También se halló una diferencia significativa en el aislamiento de *Klebsiella* con respecto a la condición corporal, presentando un mayor porcentaje de aislamiento los animales con condición corporal inferior o igual a 2 (19%;  $p=0,023$ ). Para el resto de patógenos no se observa una diferencia estadística ni por la época del año ni por la condición corporal.

Parque	Año	Mes	Nº	<i>S. sp</i>	%	<i>C. p</i>	%	G.	%	NDV	%	AIV	%
Retiro	2008	Verano	10	0	0	0	0		0	0	0	0	0
Retiro	2009	Verano	10	0	0	0	0		0	0	0	0	0
J. C. I	2009	Verano	8	1	12,5	0	0		0	5	62,5	0	0
Retiro	2010	Invierno	9	0	0	1	11,1		0	0	0	0	0
J. C. I	2010	Verano	9	0	0	0	0		0	0	0	0	0
Retiro	2011	Verano	12	0	0	0	0		0	0	0	0	0
Retiro	2014	Verano	10	0	0	0	0		0	0	0	0	0
Retiro	2014	Invierno	9	0	0	0	0		0	0	0	0	0
Retiro	2015	Verano	9	0	0	0	0		0	0	0	0	0
Retiro	2015	Invierno	10	0	0	1	10	E, E/B	10	3	30	0	0
Retiro	2016	Verano	10	0	0	0	0		0	10	100	1	10
Retiro	2016	Invierno	10	2	20	0	0		0	0	0	0	0
Retiro	2017	Invierno	10	0	0	0	0		0	0	0	0	0
Retiro	2018	Verano	10	0	0	0	0		0	0	0	0	0
Retiro	2019	Verano	10	0	0	0	0		0	0	0	1	10
Retiro	2019	Invierno	10	0	0	0	0		0	0	0	0	0
Retiro	2020	Verano	10	1	10	0	0		0	0	0	2	10
Retiro	2020	Invierno	11	0	0	0	0		0	0	0	0	0
<b>TOTAL</b>			<b>177</b>	<b>4</b>	<b>2,2</b>	<b>2</b>	<b>1,1</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>18</b>	<b>10,1</b>	<b>4</b>	<b>2,2</b>

**Tabla 18.-** Parque, año, estación, número de muestras y positivos y prevalencia de los patógenos analizados.

*S.sp*: *Salmonella spp.*; *C.p.*: *Chlamydophila psittaci*; *G.*: Genotipo de *C.p.*; *NDV*: Virus de la Enfermedad de Newcastle; *AIV*: Influenza Aviar.

Parque	Año	Mes	Nº	<i>C. j.</i>	%	<i>Y. e.</i>	%	<i>E. coli</i>	%	<i>eaeA</i>	%
Retiro	2008	Verano	10	6	60			10	100	0	0
Retiro	2009	Verano	10	0	0			8	80	0	0
J. C. I	2009	Verano	8	1	12,5			6	75	0	0
Retiro	2010	Invierno	9	2	22,2			7	77,7	0	0
J. C. I	2010	Verano	9	2	22,2			7	77,7	0	0
Retiro	2011	Verano	12	3	25			11	91,7	0	0
Retiro	2014	Verano	10	0	0			8	80	0	0
Retiro	2014	Invierno	9	1	11,1			6	66,6	0	0
Retiro	2015	Verano	9	5	55,5			8	88,9	0	0
Retiro	2015	Invierno	10	0	0			5	50	1	10
Retiro	2016	Verano	10	0	0			2	20	0	0
Retiro	2016	Invierno	10	0	0			8	80	0	0
Retiro	2017	Invierno	10	0	0	1	10	7	70	0	0
Retiro	2018	Verano	10	0	0	0	0	7	70	0	0
Retiro	2019	Verano	10	1	10	0	0	2	20	0	0
Retiro	2019	Invierno	10	1	10	0	0	6	60	0	0
Retiro	2020	Verano	10	1	10	0	0	2	20	0	0
Retiro	2020	Invierno	11	0	0	0	0	6	54	0	0
<b>TOTAL</b>			<b>177</b>	<b>23</b>	<b>13</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>	<b>116</b>	<b>65,5</b>	<b>1</b>	<b>0,6</b>

**Tabla 19.-** Parque, año, estación, número de muestras y positivos y prevalencia de los patógenos analizados.  
*C.j.*: *Campylobacter jejuni*; *Y.e.*: *Yersinia enterocolítica*.; *E. coli*: *Escherichia coli*; *eaeA*: gen de la intimina de *E. coli*

Las enterobacterias fueron identificadas, dando diferentes especies:

Año/Agente%	Ac	Sh	Ra	Pra	En	Sm	Kl	Ct	Pa	At	Klu	Po	N
2008	0	0	0	0	40	10	10	0	20	0	10	0	10
2009	0	0	0	0	16,7	5,6	22,2	5,6	0	0	0	0	18
2010	5,6	0	0	0	16,7	0	5,6	27,8	0	5,6	0	5,6	18
2011	0	0	0	0	16,7	0	16,7	0	8,3	0	0	8,3	12
2014	0	0	0	0	21,1	5,3	31,6	5,3	0	0	0	0	19
2015	0	0	0	0	21,1	10,5	5,3	0	0	0	0	0	19
2016	10,0	0	0	0	25	0	20	0	0	0	0	0	20
2017	0	10,0	0	0	20	0	10	0	0	0	0	0	10
2018	0	0	0	10	0	0	20	0	0	0	0	0	10
2019	0	0	0	0	10	5	0	5	0	5	0	0	20
2020	0	0	9,5	0	4,8	9,5	14,3	0	0	0	0	0	21
% Medio	1,7	0,6	1,1	0,6	17,0	4,5	14,1	4,5	1,7	1,1	0,6	1,1	177

**Tabla 20.-** Año de análisis y porcentaje de cada enterobacteria detectada.

Ac: *Acinetobacter sp.*; Sh: *Shewanella sp.*; Ra: *Ralstonia solanacearum*; Pra: *Providencia alcalifaciens*; En: *Enterobacter sp.*; Sm: *Serratia marcescens*; Kl: *Klebsiella sp.*; Ct: *Citrobacter sp.*; Pa: *Pantoea agglomerans*; At: *Atlantobacter hermanii*; Klu: *Kluyvera sp.*; Po: *Proteus sp*

### 5.2.2-Discusión

En cuanto a *Chlamydia psittaci*, la información sobre este patógeno en anátidas domésticas es escasa, siendo este el primer estudio que lo hace sobre anátidas en semilibertad en parques urbanos con contacto estrecho con personas y otras especies de aves. En nuestro estudio obtuvimos un porcentaje de positivos a *C. psittaci* del 2%, similar al único estudio realizado mediante PCR en el que se observó un 4,5%, de patos analizados en matadero, pero ignorando su origen y régimen de explotación (Hulin et al., 2015).

Por otra parte, el único realizado sobre aves en semilibertad, pero de granja, obtiene una seroprevalencia del 38,9%, pero no podemos comparar los datos con los nuestros al haberse realizado la detección por seroprevalencia y no sabiendo que porcentaje pertenece a las aves criadas en semilibertad, ni si tenían medidas de bioseguridad para

evitar el contacto con otras poblaciones de aves (Cong et al., 2013). En especies silvestres capturadas, el único estudio disponible hasta la fecha presenta una prevalencia del 40%, (Hegazy, 2014), también muy alta respecto a nuestro estudio, pero la detección está realizada por la visualización de cuerpos de inclusión y sobre una muestra más pequeña (50 aves silvestres). Este estudio presenta algunas limitaciones. Por una parte, el diagnóstico mediante la visualización de cuerpos de inclusión es menos sensible que los diagnósticos por PCR, sea convencional o a tiempo real, por lo que la prevalencia real podría ser incluso superior. Sin embargo, por otro lado, los cuerpos de inclusión no son especie específicos, pudiendo existir muchos falsos positivos en dicho estudio.

En *Campylobacter jejuni*, la prevalencia hallada ha sido del 12,3%. El único estudio de *Campylobacter* encontrado cuya detección fue por PCR se realizó en patos de granja, con un resultado del 69% de prevalencia (Colles et al., 2011). Al no indicar el tipo de explotación, no podemos comparar este resultado con nuestra prevalencia, ya que en régimen de explotación intensiva sería mayor el contagio entre animales que en extensivo. El resto de las detecciones e identificaciones de los diversos estudios se realizaron mediante cultivo y test bioquímico, variando los resultados desde un 2,2% Malasia (Faiza et al., 2013), pasando por un 19% en Portugal (Cabrita et al., 1992), hasta una prevalencia de un máximo del 83% en Tanzania (Nonga & Muhairwa, 2009), todos ellos patos vivos de mercado o de granja. Debido a los tipos de hábitat de los animales muestreados, como se ha explicado anteriormente, no podemos comparar esta variedad de resultados con los nuestros.

En todo caso, se observa a tenor de nuestros resultados y, sobre todo, a los disponibles en la bibliografía, que los ánades son altamente susceptibles a la infección por *C. psittaci*. En una revisión sistemática reciente, se establece que el segundo mayor riesgo de transmisión zoonótica de *Chlamydia psittaci* son los patos, después de los pavos (Hogerwerf et al., 2020), por lo que se tienen que tomar medidas adecuadas de cara al manejo de estas especies. Sorprendentemente, el genotipo identificado en los patos positivos a *C. psittaci* fue el E o E/B, ambos frecuentes en palomas y el E/B también en aves acuáticas, principalmente gansos (Qin et al., 2022). Esto contrasta con el genotipo esperado en patos domésticos, que correspondería al C (Stokes et al., 2021).

Desgraciadamente, el fragmento amplificado del gen *ompA* no distingue entre los genotipos E y E/B, por lo que no podemos llegar a una identificación definitiva del genotipo implicado en los patos positivos. En el caso de que el genotipo fuera el E/B podría deberse a su origen: la mayor parte de los patos de los parques y jardines de Madrid son patos híbridos con ganso; en el caso de que fuera el genotipo E, su origen podría ser más diverso, incluyendo a las palomas, como el principal reservorio de *C. psittaci* de Madrid (Vázquez et al., 2010). Para comprender mejor la epidemiología de *C. psittaci* en los patos híbridos de Madrid se debería hacer un estudio más amplio, abarcando más muestras positivas, y clasificando el genotipo mediante la secuenciación completa del gen *ompA*.

En el análisis realizado de enterobacterias, aunque el porcentaje de muestras positivas a *E. coli* fue muy elevado (en alguna estación fue hasta del 100%), tan solo una de las muestras (0,6%) fue positiva al gen *eaeA*, siendo negativa a los genes *stx-1* y *stx-2*, identificándose, por tanto como EPEC. No hemos encontrado estudios prácticamente en este grupo taxonómico para la detección de *E. coli* zoonóticas; enfocándose la mayoría de los mismos en la búsqueda de resistencias a antimicrobianos. Únicamente en Alemania se realizó la vigilancia de *E. coli* zoonóticas, pero no sobre animales individuales, si no en muestras de río donde estaba su hábitat (Ewers et al, 2009). La prevalencia fue del 81%, sin detección de EPEC aunque sí de ExPEC. Por lo tanto, esta es la primera vez que se detecta una cepa EPEC en anátidas, por lo que este resultado sirve para ampliar el número de especies susceptibles a la colonización intestinal por parte de esta bacteria.

El resultado hallado de *Salmonella* fue en anátidas fue de un 2,3%, siendo inferior a otros estudios que analizan también su presencia, con unas prevalencias desde el 9,8% (Tsai & Hsiang, 2005) hasta el 28,8% (Jamali et al., 2014a), pasando por el 16% de Malasia (Faiza et al., 2013), todos ellos mayores que nuestros resultados, pero con el mismo problema que los mismos estudios hechos en *Campylobacter*. Al no indicar el tipo de explotación, intensiva o extensiva, no podemos indicar estos factores como de riesgo que justifiquen una mayor prevalencia en dichos estudios.

En cuanto a otras enterobacterias, destaca la baja presencia de *Yersinia enterocolitica* (0,6%). Existen reportes de prevalencias algo mayores, como el 4,5% hallado en China (Peng et al., 2018) y el 2,4% en Irán (Jamali et al., 2014b). Sin embargo, en los dos estudios citados el muestreo es sobre animales de granja o de mercado, y no en semilibertad, lo que podría explicar la mayor prevalencia hallada. Sin embargo, en un estudio en Polonia sobre patos silvestres, no se consiguió aislar ninguna cepa de *Yersinia enterocolitica* (Odyniec et al., 2020). De estos estudios podría deducirse que existen una influencia entre el grado de libertad y la prevalencia de este patógeno, posiblemente debido a la mayor densidad de población en los sistemas intensivos.

En la detección de influenza aviar, cuyo principal reservorio son las anátidas, casi todos los estudios realizados son sobre patos domésticos vivos que se venden en los mercados que son habituales en China y Asia, no aportando información sobre la procedencia y el tipo de explotación, o en distintas especies de anátidas silvestres, siendo en todos los casos, escenarios ecoepidemiológicos diferentes a los del actual estudio, es decir patos domésticos o híbridos, en semilibertad, con contacto con otros animales, pero sin capacidad de vuelo. Aunque solo uno de ellos utiliza RT-PCR (previa inoculación en embrión de pollo) (Li et al., 2016), y el otro, técnicas de inmunodifusión (Abtin et al., 2022), los resultados son semejantes entre ellos (0,9 y 0,5% respectivamente), siendo inferior a nuestros resultados (2,3%).

El único estudio realizado con patos domésticos criados en libertad (Songserm et al, 2006) en comparación con otros regímenes de explotación, da prevalencias muy altas de un 45% (frente a la ausencia en régimen cerrado o al 23% en semilibertad). Es interesante la mayor prevalencia en régimen de libertad, en lo que podría ser extrapolable a nuestro estudio, ya que se supone que estarían en contacto con poblaciones silvestres, pero se detectó por hemoaglutinación, técnica menos sensible que la de este trabajo. Además, todas las aves analizadas estaban enfermas o muertas, lo que añade un sesgo en el muestreo al haber una selección previa de enfermedad.

En cuanto a la patogenicidad del virus de gripe aviar, afortunadamente, los virus detectados fueron negativos a las cepas de alta patogenicidad, como son las H5 y H7.

Una de las medidas más polémicas durante las epizootias de gripe aviar es la retirada de los patos de los parques y jardines públicos, con el fin de no propagar la enfermedad. Sin embargo, se sabe que existe protección cruzada entre cepas de baja y alta patogenicidad (Wang et al., 2018), por lo que la retirada de aves previamente inmunizadas a cepas de baja patogenicidad es, como mínimo, controvertido. Además, en un estudio retrospectivo, no publicado, realizado por el Grupo de Epidemiología y Sanidad Ambiental, del Centro de Investigación en Sanidad Animal (INIA-CISA-CSIC), se obtuvieron seroprevalencias frente a gripe aviar, en estas mismas aves de estudio (muestras de 2008 a 2014) cercanas al 100%. Conocer el estatus sanitario previo a un evento epizootico es fundamental para tomar las medidas más precisas y ajustadas al escenario epidemiológico concreto. Por ello, la vigilancia sanitaria periódica en la fauna de los parques y jardines, tanto activa como pasiva, es indispensable para minimizar los efectos de futuras emergencias de enfermedades.

En cuanto al virus de la enfermedad de Newcastle cabe destacar que nuestros resultados son de un 10,1% de positivos con respecto al total, pero solo se hallaron positivos en tres de los muestreos estacionales. En uno de ellos, la prevalencia creció de un 30% a un 100% en un semestre, lo que parece indicar una gran difusión de la enfermedad una vez establecida. Este aumento de la proporción de positivos, sin embargo, no tuvo como consecuencia enfermedad o brote de mortandad en las poblaciones de anátidas del parque de El Retiro. Si bien no se identificó la patogenicidad de las cepas, debido a la ausencia de mortalidad podrían considerarse lentogénicas o mesogénicas. Este escenario es muy similar al del virus de la influenza aviar, donde, en un estudio previo, el 30,4% de los patos analizados de estos parques presentaba anticuerpos frente a la enfermedad de Newcastle (Esperón et al., 2014), sugiriendo que la presencia del virus de la enfermedad de Newcastle es ampliamente distribuida en estos parques. También, la excreción del virus en estos animales es puntual, en comparación con la duración de la seroprevalencia. Por ejemplo, en el estudio anteriormente citado, también se analizaron gansos domésticos en semilibertad y palomas bravías (*Columba livia*), sumando un total de 296 muestras. A pesar de hallar un 56,3% de seroprevalencia en gansos y un 42.9% en palomas (además del 30,4% en patos), tan solo 7 de estos individuos fueron positivos a la detección del virus por RT-rtPCR (Esperón et al., 2014).

Por tanto, al hallar un 10,1% de prevalencia global en el presente estudio, es posible que el virus de la enfermedad de Newcastle esté mucho más distribuido en estas poblaciones.

En general, las prevalencias halladas en los distintos trabajos son muy bajas en relación con los resultados obtenidos en el presente estudio. Un resultado muy inferior (0,2%) fue hallado en animales de granja mediante RT-PCR previa inoculación en embriones de pollo (Lee et al, 2009) y animales de mercado y silvestres (Kim et al., 2012). En ambos casos es difícil extrapolar los resultados a los nuestros, ya que son aves de granja de los que desconocemos el tipo de explotación, o de animales de granja y silvestres de los que conocemos los distintos porcentajes del muestreo.

En cuanto a las aves de mercado, un estudio en Corea sobre pollos y pavos mediante RT-rtPCR y caracterización molecular posterior detectó genotipos de la cepa vacunal del NDV patos no vacunados, demostrando así un contagio de las aves de corral vacunadas a otros patos, perdiendo de esta manera su valor epidemiológico (Choy et al., 2012).

### **5.3-Paseriformes**

#### **5.3.1-Resultados en paseriformes**

Se capturaron a conveniencia 63 aves pertenecientes a 17 especies, procedentes de dos parques diferentes a lo largo de septiembre de 2019: Juan Carlos I (n=24; predominio de aves residentes) y Madrid Río (n=39; predominio de aves migratorias). Ninguna de las aves resultó positiva a *Chamydia psittaci*, *Campylobacter jejuni*, *Mycoplasma gallisepticum*, Influenza Aviar y virus de la enfermedad de Newcastle.

En cuanto al cultivo e identificación de enterobacterias, de todas las colonias de morfología compatible con *E. coli*, sólo una de ellas fue clasificada como tal, siendo esta negativa a todos los factores de patogenicidad. Así mismo, ninguna cepa con

crecimiento compatible con *Salmonella* sp. fue positiva a la detección mediante PCR. La identificación del resto de las colonias figura en la Tabla 21. Se obtuvieron un total de 18 aislados diferentes; destacando la presencia de *Aeromonas* sp., con una prevalencia general del 42,9%. El resto de los agentes identificados se hallaron con una baja frecuencia, por debajo del 5%. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre aves migratorias y no migratorias.

Especie	n	Ae	At	Ct	Cr	El	En	Ec	Es	Ka	Kl	Mo	Psa	Pr	Pa	Ps	Sm	Sr
Agc	1	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
Cac	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	50	0	0	0
Cucb	4	50	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cucp	6	66	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cut	1	100	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0
Ec	1	100	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0
Gc	3	33.3	0	0	0	0	0	0	0	0	33.3	0	0	0	0	0	0	0
Gm	10	20	10	0	10	10	0	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10
Hc	7	57.1	0	0	0	0	14.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lb	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	100	0	0	0	0
Lc	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mc	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mm	6	83.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16.7	0	0	0	0	0	0
Pc	13	46.2	0	7.7	0	0	7.7	0	7.7	0	0	0.0	7.7	7.7	7.7	15.4	7.7	0
Pe	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pv	3	33.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ptr	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>63</b>	<b>42.9</b>	<b>1.6</b>	<b>1.6</b>	<b>1.6</b>	<b>1.6</b>	<b>3.2</b>	<b>1.6</b>	<b>1.6</b>	<b>3.2</b>	<b>3.2</b>	<b>3.2</b>	<b>1.6</b>	<b>3.2</b>	<b>3.2</b>	<b>3.2</b>	<b>1.6</b>	<b>1.6</b>

Tabla 21.-. Porcentaje de aparición de las distintas bacterias aisladas en el estudio, clasificado por especie.

**Especies de aves:** Agc: Agateador común; Cac: Carbonero común; Cucb: Curruca cabecinegra; Cucp: Curruca capirotada; Cut: Curruca tomillera; Ec: Estornino común; Gc: Gorrión común; Gm: Gorrión molinero; Hc: Herrerillo común; Lb: Lavandera blanca; Lc: Lavandera cascadeña; Mc: Mirolo común; Mm: Mosquitero musical; Pc: Papamoscas cerrojillo; Pe: Petirrojo europeo; Pv: Pinzón vulgar; Ptr: Pito real. **Especies bacterianas:** Ae: *Aeromonas sp*; At: *Atlantibacter hermanii*; Ct: *Citrobacter sp*; Cr: *Cronobacter sp*; El: *Enterobacter ludwigii*; En: *Enterobacter sp*; Es: *Escherichia sp*; Ka: *Klebsiella aerogenes*; Kl: *Klebsiella sp*; Mo: *Morganella morganii*; Pa: *Pantoea agglomerans*; Pr: *Providencia sp*; Psa: *Pseudomonas aeruginosa*; Ps: *Pseudomonas sp*; Sm: *Serratia marcescens*; Sr: *Serratia rubidae*

### 5.3.2-Discusión

No se ha detectado ningún positivo a *Chlamidia psittaci* en los 63 animales muestreados. En los tres estudios realizados en Europa., detectan una prevalencia del 9,4% en Holanda (Madani & Peighambari, 2013), un 22,7% en Polonia (Krawiec et al., 2015), y finalmente un 2,9% en Suecia (Olsen et al., 1998). En los tres casos la detección se realiza por rtPCR, por lo que la técnica empleada se puede considerar similar en términos de sensibilidad y especificidad. En los dos primeros casos, las muestras se toman de animales muertos recolectados en los jardines de particulares, lo cual añade un sesgo al método de muestreo. En Suecia las aves sí son capturadas, como en nuestro caso, en redes japonesas, y es el que arroja de hecho, una menor prevalencia. Por tanto, el estatus sanitario previo podría influir en la prevalencia de *C. psittaci*.

También fueron negativas todas las muestras a *Campylobacter jejuni*, resultados acordes con otros estudios como el de Croacia (Vlahović et al., 2004), sobre 20 paseriformes, que también tuvo una detección negativa.

Dentro de las enterobacterias, ninguna de las muestras analizadas dio positivo a cepas zoonóticas de *E. coli*. El único estudio estrictamente en paseriformes es en Brasil, pero con canarios de jaula, y por cultivo (Horn et al., 2015), la bacteria más aislada sobre 61 muestras fue la *E. coli* en el 41% de los casos, aunque no las identifica como patógenas. Además, este último estudio no es comparable al nuestro, debido a la condición de cautividad. También en Brasil se encontró un 4,61% de prevalencia en 88 ejemplares de también de canarios de jaula, y dentro de ellas dos EPEC (Beleza et al., 2019).

Tampoco se detectaron animales positivos a *Salmonella* spp., al contrario que en Croacia (Vlahović et al., 2004), que sobre 20 paseriformes se detectó un 10% de prevalencia a esta bacteria. En cuanto al resto de enterobacterias, se han encontrado únicamente dos estudios de enterobacterias en paseriformes, uno en Suecia (Vlahović et al., 2004), con 2 positivos a *Yersinia* sp. sobre 43 mirlos comunes y otro en Sicilia (Foti et al., 2011), con aproximadamente un 3% de *Klebsiella* y *Yersinia*.

En nuestro estudio la única bacteria relevante ha sido *Aeromonas spp.*, cuyo hallazgo no se describe en otras publicaciones en paseriformes de vida libre. *Aeromonas* es un género de bacterias Gram negativas, perteneciente a la clase Gammaproteobacteria, familia Aeromonadaceae. Si bien las bacterias del género *Aeromonas* no son consideradas patógenos primarios en humanos y aves, en los primeros existen descripciones de infecciones oportunistas, siendo los estratos etarios de menor y mayor edad los más susceptibles (Nzeako et al., 2002). En aves, existen descripciones de enfermedad por *Aeromonas sp.* en gallinas (Dashe et al., 2014, Jindal et al., 1993), pavos (Gerlach & Bitzer, 1971), patos (Zbikowski et al.- 2006), psitácidas (García et al., 1992) y rapaces (Needham et al., 1979), entre otros. En paseriformes, hay casos descritos de diarrea y pérdida de peso en canarios (Glunder, 1989).

En nuestro estudio no hubo positivos a influenza aviar; hecho que contrasta con otros publicados, como el 0,89% de prevalencia hallada en paseriformes en Estados Unidos (Fuller et al., 2010; Williams et al., 2012), y el 2,4% en Perú (Williams et al., 2012). Sin embargo, en otros estudios realizados en el continente europeo, como en Francia (Lebarbenchon et al., 2010) e Italia (De Marco et al., 2003), los resultados fueron negativos en ambos casos. Además, en el único realizado en España el resultado fue también negativo (Busquets et al., 2009), lo cual concuerda con la ausencia de esta enfermedad en aves paseriformes de nuestro estudio. La diferencia entre ambos continentes, mencionada ya en la introducción, puede deberse entre otras variables, a diferencias entre el rango de hospedadores de las variantes circulantes de AIV en ambos continentes, a la susceptibilidad de las especies analizadas, o a la situación epidemiológica en cada continente.

En cuanto a Newcastle, también negativo en nuestro estudio, solo se han encontrado dos estudios, uno en Irán, con un 35% de prevalencia (Khalafi et al., 2023) y en Brasil, con un 10,7% (Silva et al., 2006). En uno de los casos la detección fue por cultivo y en la otra previa inoculación en embrión de pollo, técnicas menos sensibles que la empleada en nuestro estudio, por lo que las diferencias podrían ser incluso superiores.

## 5.4.-Discusión general

Para el 2050 se estima que dos tercios de la población mundial viva en ciudades (UN, 2008). Este fenómeno, el de la urbanización, conlleva una pérdida del contacto del ser humano con la naturaleza. Por ello, surge la necesidad de establecer en las ciudades una planificación urbanística que cuente con zonas verdes. En este sentido, se sabe que la biodiversidad aporta al ser humano una serie de beneficios. Por ejemplo, se sabe que mejora la microbiota y, con ello, se disminuyen las alergias (Hanski et al., 2012). En paralelo, la urbanización conlleva un aumento en la diversidad de interacciones entre la fauna silvestre y el ser humano (Hassell et al., 2017). Muchas de las enfermedades emergentes en humanos surgen de fenómenos directa o indirectamente relacionados con la urbanización (Hassell et al., 2017). Sin embargo, a pesar de esto, existen apenas estudios en la fauna urbana, y muy especialmente en la ornitofauna. Los tres grupos de aves estudiados en la presente tesis (paseriformes silvestres, ornamentales e invasoras), a pesar de ser abundante y representativos de los parques y jardines están muy poco representados en la bibliografía consultada. En la comparación de las especies seleccionadas con otros estudios en estas mismas especies, no hemos podido encontrar ningún trabajo que tenga como diana las poblaciones específicas de parques y jardines; centrándose la mayoría de ellos, o en avicultura o en aves de jaula.

Por ello, resulta muy difícil establecer comparaciones sobre cuál es el estatus sanitario de los animales analizados en el presente estudio con respecto al promedio de los estudios publicados. Es más, la mayoría de los estudios consultados no coinciden en fechas con los nuestros, a veces en más de dos décadas, y las detecciones y prevalencias mostradas son en lugares tan distantes como Asia o Sudamérica, habiendo muy pocos trabajos que se hayan realizado a partir del 2014 (fecha en la que comienza este estudio). Por lo tanto, existe una heterogeneidad y dispersión de resultados, que se agrava aún más debido a que la mayoría de los estudios no se limitan a una especie o a un grupo taxonómico más estrecho, sino que se trata de muestreos sobre aves en general.

En este estudio se ha analizado los grupos principales de fauna que pueden tener una interacción sanitaria con las personas, exceptuando a las palomas, lo cual se comprueba en los diferentes censos de avifauna de parques urbanos que tenemos a nuestra disposición. Aparte de la fauna doméstica o asilvestrada, como los gatos y perros, las aves son las que más interaccionan con la población humana debido a las deposiciones de heces y a la alimentación, ya sea por usuarios del parque, como por parte del servicio de mantenimiento de fauna de los respectivos parques, donde varias especies (palomas, patos y passeriformes) comparten en un momento dado espacio y mantienen un contacto que no tendrían de normal en la vida silvestre. Estos puntos de contacto artificial pueden facilitar el salto de agentes infecciosos entre distintas especies, pudiendo amplificar la carga total del agente infeccioso en cuestión. Este puede ser el caso de la presencia de los genotipos B, E y E/B de *Chlamydia psittaci* en cotorras grises. El resultado esperable en la búsqueda de este patógeno en esta especie era la infección por el genotipo A, el endémico en psitácidas (Stokes et al., 2021). Sin embargo, la presencia de los genotipos anteriormente mencionados sugiere la transmisión de paloma a cotorra gris. Esto también se ha observado en la población de patos del Retiro, el que más uso público y de afluencia de visitantes tiene dentro de esta investigación. El genotipo hallado en esta bacteria es del tipo E o E/B, genotipos presentes en las palomas de Madrid (Esperón et al., 2012), en contraposición con el genotipo C, que es el observado en aves acuáticas (Stokes et al., 2021). La presencia de palomas en los puntos de alimentación de las aves acuáticas en este parque, puede ser el foco de transmisión entre ambas especies. Este salto de especie podría estar ocurriendo también con *Campylobacter jejuni*, entre palomas, cotorras y patos; si bien, se trata de una bacteria bastante cosmopolita en un número muy elevado de especies aviares (Ahmed & Gulhan., 2022), y desconocemos el origen de las bacterias detectadas en nuestro estudio (Figura 20). Por otra parte, en el único estudio realizado en palomas en la ciudad de Madrid, en el 2010 se hallaron prevalencias de hasta 60% de *Chlamydia psittaci*, frente al actual del 23,8% de las cotorras y del 1,2% de los patos y del 86% en *Campylobacter*, en contraposición con la ausencia de este agente en cotorras y un 13% en patos (Vázquez et al., 2010). La mayor presencia de positivos en palomas puede indicar que se trate del reservorio principal para estos patógenos, produciendo contagio a otras especies mediante el efecto *spillover*.



**Figura 20.**-Cotorras y palomas compartiendo alimento en suelo

Este estudio comprueba que tanto las cotorras de los parques como las anátidas presentes en las superficies de agua, tienen distintas prevalencias de Influenza Aviar y de la Enfermedad de Newcastle, que varían en el caso de los patos a lo largo de los años analizados. En las aves de producción ambas son enfermedades de Declaración Obligatoria de la OMSA. También, en el caso de las aves silvestres, las cepas de alta patogenicidad del virus de la gripe aviar son de notificación obligatoria. La presencia del virus de la gripe aviar en un 2,25% de los patos analizados fue motivo de preocupación por las potenciales consecuencias sanitarias. Afortunadamente, las muestras fueron negativas a los subtipos de influenza aviar de alta patogenicidad (H5 y H7), lo cual significa que estas aves están infectadas por cepas poco patogénicas de gripe aviar. Esto está en concordancia con la ausencia de clínica en las aves positivas, como también en la muestra analizada (enema cloacal). En patos, las cepas de baja patogenicidad de AIV suelen tener mayor excreción digestiva que respiratoria (Costa et al., 2011). Por otra parte, la prevalencia real de AIV en los patos probablemente sea muy superior a la hallada, ya que la excreción digestiva del virus de produce en una ventana de unos 14 días post infección (Brown et al., 2012). Por ello, con el fin de conocer la exposición real al virus de una población, se recomienda la detección de anticuerpos. En este sentido, en los patos de los parques analizados, durante los periodos de 2007 a 2010, se obtuvo una prevalencia del 62% de anticuerpos frente a AIV (dato no publicado; informe final del Proyecto FAU2008-00001-C02-01), también en ausencia de la enfermedad. Esto

significa que el virus de la influenza aviar (probablemente cepas de baja patogenicidad) sea muy prevalente en las poblaciones de patos ornamentales. Y, debido a la inmunidad parcial cruzada que los anticuerpos frente a AIV podrían conferir entre las distintas variantes (Radvak et al., 2016), éstos podrían actuar de barreras para la dispersión de cepas de AIV de alta patogenicidad. Por ello, se recomienda para prevenir futuros brotes de AIV de alta patogenicidad, el análisis serológico en las poblaciones ornamentales, y en caso de presentar anticuerpos no retirar los animales de las láminas de agua. Esto evitaría, al menos en parte, que dichas láminas sean ocupadas por anátidas silvestres, potencialmente portadoras de las cepas de alta patogenicidad. En cuanto a las ocho cotorras de Kramer positivas a AIV no se pudo descartar la presencia de cepas de alta patogenicidad, por falta de muestra. En este sentido, se ha demostrado que las cepas de alta patogenicidad de AIV producen también infecciones de curso mortal en algunos géneros de psitácidas, incluyendo *Psittacula* y *Myiopsitta* (Kaleta & Docherty, 2007). Por tanto, al igual que con las anátidas, debido a la ausencia tanto de cuadro clínico como de reportes de mortalidad en esta especie, la explicación más plausible de la infección por AIV en cotorras de Kramer es que se traten de cepas de baja patogenicidad.

Durante la justificación de la presente tesis se argumentaba que la importancia de la vigilancia sanitaria en fauna invasora era el riesgo potencial de la introducción de nuevas enfermedades. Sin embargo, las poblaciones de cotorras analizadas no parecen ser portadores de enfermedades exóticas o emergentes, teniendo un estatus sanitario mejor que la población más abundante y con más contacto con personas en las grandes ciudades, la paloma bravía. No obstante, estas especies podrían desempeñar un papel como amplificadores y dispersores de agentes infecciosos ya existentes en otras especies con las que cohabitan. Podría ser especialmente importante el papel de las cotorras grises, ya que presentan un comportamiento más gregario y de alimentación en el suelo, con otras especies, como las palomas. Este papel amplificador de algunos agentes infecciosos puede verse agravado por el crecimiento exponencial de las poblaciones de cotorras argentinas en España, y más concretamente, en Madrid. En esta ciudad, la población de cotorra argentina ha pasado de media de 7720 individuos en 2015 a 12064 en el año 2019. Los datos a nivel mundial también son preocupantes, estando presentes como especie invasora en al menos tres continentes (Edelaar et al., 2015). A pesar de

esta expansión y de su ubicuidad, el presente es el estudio sanitario más completo hasta la fecha. Nuestro estudio subraya la relevancia sanitaria de la cotorra argentina, como dispersor de agentes zoonóticos, y pone de manifiesto la necesidad de aumentar los estudios en otras áreas y regiones bioclimáticas, donde esta especie presente también un estatus de invasora.

En cuanto a las poblaciones de passeriformes de los parques, que engloban a más de la mitad de la avifauna existente, se ha comprobado en este estudio la ausencia de zoonosis relevantes, más allá de bacterias del género *Enterobacter*, que tienen un potencial zoonótico limitado. Esto puede ser debido al menor contacto con el resto de la avifauna, con la excepción del gorrión común, y a la forma de anidación, que generalmente es en nidos individuales.

El presente estudio empleaba especies de aves como modelo para el estudio del comportamiento de las enfermedades zoonóticas en fauna ornamental, autóctona con potencial migratorio e invasora. Las hipótesis de partida se basaban en que tanto la fauna migratoria como la invasora, podrían introducir enfermedades exóticas o nuevas cepas de las ya presentes; y que las poblaciones residentes y ornamentales, podrían servir como centinelas de dichas enfermedades. Los resultados obtenidos muestran que, de las hipótesis iniciales, sólo se ha podido verificar que las anátidas ornamentales sirven como centinelas de enfermedades zoonóticas, y en el caso de las aves introducidas pueden servir como amplificadores de patógenos ya existentes.

Algunas preguntas que han sido tangencialmente expuestas en el presente trabajo permanecen sin resolver, y deberían de ser abordadas en futuros estudios. Una de ellas es la relación epidemiológica entre las palomas y las especies estudiadas, principalmente las cotorras argentinas y los patos domésticos ornamentales. En un escenario de pérdida de biodiversidad, se observa una disminución de especies especialistas y una homogenización de la funcionalidad de los ecosistemas, que se caracteriza por un aumento en las poblaciones de especies generalistas (Marcacci et al., 2021), como las palomas bravías. A este efecto hay que unir la introducción de especies invasoras, como la cotorra de pecho gris. Este cambio en las comunidades puede favorecer la transmisión

de patógenos al reducir el efecto de dilución de la biodiversidad, un mecanismo por el cual comunidades diversas limitan la propagación de agentes infecciosos al "diluir" la densidad de hospedadores competentes (Keesing et al., 2010). Los resultados de la presente tesis muestran que los passeriformes estudiados no comparten agentes infecciosos con estas especies, reforzando la importancia de implementar medidas para conservar la biodiversidad y, con ello, limitar la propagación de enfermedades zoonóticas o de fauna silvestre. También sería recomendable para futuros estudios el empleo de otros modelos de aves migratorias, como las anátidas silvestres, y de aves residentes, como urracas u otros córvidos.

Por último, la relación humano-animales ornamentales-migratorios-introductos, debería de ser abordada, mediante la comparación sanitaria de parques urbanos con mayor y menor uso humano. Todo esto, ayudaría al diseño y mejora de la calidad sanitaria de los espacios públicos de las ciudades.

## 6.-Conclusiones

1.-En las cotorras grises argentinas destacaron los agentes *Chlamydophila psittaci* y *Escherichia coli* EPEC, con una prevalencia del 23,8 y el 9,5% respectivamente.

2.-En las cotorras de Kramer destacó la presencia de Influenza Aviar, *Escherichia coli* EPEC, y del virus de la enfermedad de Newcastle, con unas prevalencias del 13,3%, 15% y 3,3% respectivamente.

3.-La presencia de genotipos de paloma en cotorra gris sugiere un estrecho contacto entre ambas, y la posibilidad de salto de especie de dichos genotipos.

4.-El principal hallazgo en anátidas semidomésticas fue *Campylobacter jejuni* con una prevalencia del 13%, seguido por el virus de la enfermedad de Newcastle con una del 10,1%, seguido de prevalencias menores en *Salmonella* spp., *Escherichia coli* EPEC, Influenza Aviar y *Yersinia enterocolítica*.

5.-Los datos obtenidos en Influenza Aviar y enfermedad de Newcastle demuestran la importancia de emplear los patos de parques y jardines como centinelas de dichos agentes infecciosos.

6.-La ausencia de patógenos relevantes en aves passeriformes puede estar relacionada con una falta de contacto con las otras especies del estudio.

7.-Los resultados demuestran que las especies invasoras pueden ser amplificadoras de patógenos frecuentes en otras especies, como las palomas.

## **ANEXO**

Infectious agents present in monk parakeet (*Myiopsitta monachus*) and rose-ringed parakeet (*Psittacula krameri*) invasive species in the parks of Madrid and Seville, Spain.



## OPEN ACCESS

EDITED BY  
Marta Canuti,  
University of Milan, Italy

REVIEWED BY  
Jesús Cardells,  
Universidad CEU Cardenal Herrera, Spain  
Esperanza Gomez-Lucia,  
Complutense University of Madrid, Spain

\*CORRESPONDENCE  
Juan López  
✉ juanloro@uax.es

†These authors share first authorship

RECEIVED 09 February 2023  
ACCEPTED 17 July 2023  
PUBLISHED 07 August 2023

CITATION  
López J, Mogedas M, Ballesteros C,  
Martin-Maldonado B, Sacristán I, García R,  
Ortiz JC and Esperón F (2023) Infectious agents  
present in monk parakeet (*Myiopsitta  
monachus*) and rose-ringed parakeet  
(*Psittacula krameri*) invasive species in the parks  
of Madrid and Seville, Spain.  
*Front. Vet. Sci.* 10:1162402.  
doi: 10.3389/fvets.2023.1162402

COPYRIGHT  
© 2023 López, Mogedas, Ballesteros,  
Martin-Maldonado, Sacristán, García, Ortiz and  
Esperón. This is an open-access article  
distributed under the terms of the [Creative  
Commons Attribution License \(CC BY\)](#). The use,  
distribution or reproduction in other forums is  
permitted, provided the original author(s) and  
the copyright owner(s) are credited and that  
the original publication in this journal is cited, in  
accordance with accepted academic practice.  
No use, distribution or reproduction is  
permitted which does not comply with these  
terms.

# Infectious agents present in monk parakeet (*Myiopsitta monachus*) and rose-ringed parakeet (*Psittacula krameri*) invasive species in the parks of Madrid and Seville, Spain

Juan López<sup>1,2\*†</sup>, María Mogedas<sup>1†</sup>, Carlos Ballesteros<sup>2</sup>,  
Bárbara Martín-Maldonado<sup>2,3</sup>, Irene Sacristán<sup>4</sup>, Raúl García<sup>2</sup>,  
Juan Carlos Ortiz<sup>5</sup> and Fernando Esperón<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Veterinary Faculty, Universidad Alfonso X El Sabio Avenida de la Universidad 1, Villanueva de la Cañada, Madrid, Spain, <sup>2</sup>Servicio de Consultoría para la Recuperación y Ordenación de la Fauna y su Ambiente S. L. (SCROFA), Madrid, Spain, <sup>3</sup>Veterinary Department, School of Biomedical and Health Sciences, Universidad Europea de Madrid, Villaviciosa de Odón, Madrid, Spain, <sup>4</sup>Centro de Investigación en Sanidad Animal (SIC-INIA), Valdeolmos, Spain, <sup>5</sup>Departamento de Fauna y Biodiversidad, Área de Gobierno de Medio Ambiente, Ayuntamiento de Madrid, Madrid, Spain

**Introduction:** The introduction of invasive species into an ecosystem could result in biodiversity loss and the spread of infectious agents that could cause re-emergent or emergent zoonotic diseases. Monk parakeets (*Myiopsitta monachus*) and rose-ringed parakeets (*Psittacula krameri*) are considered widespread invasive exotic species in urban habitats from the Iberian Peninsula. The aim of this study was to assess the presence of relevant infectious agents in wild parakeets captured in urban parks in Madrid and Seville (Spain).

**Methods:** A total of 81 cloacal samples were collected and analysed using molecular techniques.

**Results:** The prevalence of infectious agents varied between parakeet species: 9.5% of monk parakeets and 15% of rose-ringed parakeets were positive for enteropathogenic *E. coli* (EPEC), 13.3% of rose-ringed parakeets for avian influenza virus (AIV), 3.3% of rose-ringed parakeets for Newcastle disease virus (NDV), and a 23.8% of monk parakeets for *Chlamydia psittaci*.

**Discussion:** All *C. psittaci*-identified isolates were classified as B, E, or E/B genotypes, indicating transmission from wild urban pigeons to parakeets. These results highlight the need for monitoring parakeet populations due to the implications for human and animal health.

## KEYWORDS

*Myiopsitta monachus*, one health, *Psittacula krameri*, real time PCR, urban parks, zoonotic pathogens, invasive species

## 1. Introduction

The introduction of invasive species into a new environment where they have never been before may have the same negative effects on the ecosystem as the introduction of exotic diseases, which can lead to biodiversity loss or even the extinction of local species (1). In this sense, numerous issues have been reported around the world, such as the loss of amphibian populations caused by *Batrachochytrium dendrobatidis*, a fungus carried by the African clawed frog (*Xenopus laevis*) (2), or the decline of the European red squirrel (*Sciurus vulgaris*) in the United Kingdom due to a poxvirus transmitted by the American grey squirrel (*Sciurus carolinensis*) (3). Moreover, invasive species can also lead to the emergence, or re-emergence, of zoonotic diseases (4). An example is the role of coypus (*Myocastor coypus*) in the spread of zoonotic *Leptospira* (5), or raccoons (*Procyon lotor*) as hosts for *Baylisascaris procyonis*, which causes neurological and ocular disease in humans (6).

Regarding the Aves Class, up to 971 introduced bird species have been reported in 230 countries (7). However, only a few studies confirmed the introduction of diseases by alien bird species, mostly restricted to sporadic cases (8). The most relevant was the historical exportation of feral pigeons (*Columba livia*) from the Mediterranean countries. This synanthropic species has been proven to carry more than 110 zoonotic pathogens (9); some of them in high proportions, such as *Campylobacter jejuni* and *Chlamydia psittaci* (10). Other alien species carrying zoonotic pathogens described in the scientific literature are the house sparrow (*Passer domesticus*), the common starling (*Sturnus vulgaris*), and the song thrush (*Turdus philomelos*) (8). Therefore, health status variables should be included when conducting foreign species risk assessments to evaluate the introduction of new agents and the changes in the epidemiology of existing ones (11).

In Spain, the estimated monk parakeet (*Myiopsitta monachus*) population was between 18,980 and 21,455 in 2016 (13), while the rose-ringed parakeet (*Psittacula krameri*) population ranged between 3,005 and 3,115 in 2015 (14). Since then, the populations of both species have largely increased. For example, in the capital, Madrid, the population of monk parakeets grew from 7,248–8,193 in 2015 to 11,154–12,975 in 2019 (15). Although both species are worldwide invasive gregarious Psittacidae, monk parakeets build communal nests that can be used by other species (13), which favours the diffusion, amplification, and spread of numerous pathogens, while rose-ringed parakeets do not. Instead, after the mating season, rose-ringed parakeets gather to roost reaching high-density flocks that pose the same hazard as communal nests. However, there is a lack of knowledge about the infectious agents that both invasive species can harbour.

In this context, the aim of this study was to assess the presence of zoonotic and loss biodiversity-related infectious agents in both species, namely monk parakeets and rose-ringed parakeets, from two densely populated Spanish cities.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Samples and the areas of study

Due to the invasive ability of monk parakeets and rose-ringed parakeets, Spanish legislation includes an invasive species

TABLE 1 Captured birds (N), number of analysed animals (N analysed), and percentage of animals analysed (%N) from the city council of Sevilla and Madrid, respectively.

City	Species	N	N analysed/% N	Threshold prevalence
Sevilla	<i>Psittacula krameri</i>	1,798	60/(3.3%)	4.8%
Madrid	<i>Myiopsitta monachus</i>	1,023–1,135	21/(1.9–2.1%)	13.2%

control program in which the removal of nests and euthanasia of trapped birds from these species are considered key to reducing populations (12).

First, the population size of each species in the different capture areas was established based on previous studies (16–19). Then, captures of monk parakeets in Madrid were performed between 2016 and 2017, while captures of rose-ringed parakeets in Sevilla took place between 2019 and 2020. Birds were trapped with both floor decoys with clap nets and nest traps. The sampling size (monk parakeets = 21 and rose-ringed parakeets = 60) was sufficient to detect a minimum expected prevalence of 13.2% and 4.8% in monk parakeets and rose-ringed parakeets, respectively for each analysed pathogen (Table 1) ([www.winepi.net](http://www.winepi.net)).

All the captured birds were checked by a veterinarian and sampled before euthanasia to obtain the cloacal content by enema, as described by Vázquez (10). In brief, 1 mL of sterile PBS was introduced into the cloaca using a sterile Pasteur pipette and immediately aspirated. The cloacal sample was transferred into a 2-ml microtube and diluted to a total volume of 2 ml to perform further analysis.

Handling procedures complied with European (Directive 2010/63/EU) and Spanish legislation (Royal Decree 53/2013). For sample collection, ethics approval was not necessary as samples were collected within the framework of a veterinary disease control intervention, and sampling was performed following standard procedural guidelines.

### 2.2. Pathogen detection

For each sample, RNA and DNA extraction were simultaneously performed from the cloacal enema using a pressure filtration method (QuickGene DNA Tissue Kit S, Fujifilm Life Science, Tokyo, Japan) and adding an RNA carrier (20).

Real-time PCRs (RT-PCRs) based on TaqMan™ probes were performed for the partial amplification of the *incA* gene of *Chlamydia psittaci* (21), the *mapA* gene of *Campylobacter jejuni* (23), and the *Prot6e* gene of *Salmonella* spp. (26). Samples positive for *C. psittaci* were typed by RT-PCR based on Eva Green, with high-resolution melting (HRM) analysis (22), which amplifies a partial fragment (274 bp) of the *ompA* gene. Positive confirmation was sought by Sanger sequencing of the amplicons. In addition, real-time reverse transcriptase (RT-rtPCR) based on TaqMan™ probes was performed to detect the avian influenza virus (AIV) matrix gene (24) and the Newcastle disease virus (NDV) matrix gene (25). Finally, zoonotic *E. coli* was detected following the protocol described previously for the detection of the intimin gene

TABLE 2 Methods used for determining infectious agents.

Agent/gene	Method	Primers/probe	Annealing temperature (°C)	Reference
AIV	RT-rtPCR (TaqMan probe)	5'-AGATGAGTCTTCTAACCGAGGTCG-3' 5'-TGCAAAAACATCTCAAGTCTCTG-3' 5'-(6FAM)TCAGGCCCCCTCAAAGCCGA-BHQ1-3'	60	(24)
<i>C. jejuni</i>	rtPCR (TaqMan probe)	5'-CTGGTGGTTTTGAAGCAAAGATT-3' 5'-CAATACCAGTGTCTAAAGTGGGTTTAT-3' 5'-(6FAM)AATTCACACATCGCTAATG-MGB-3'	60	(23)
<i>C. psittaci</i> (detection)	rtPCR (TaqMan probe)	5'-GCCATCATGCTTGTTCGTTT-3' 5'-CGGCGTGCCACTTGAGA-3' 5'-(6FAM)TCATTGTCATTATGGTGATTCAGGA-MGB-3'	60	(21)
<i>C. psittaci</i> (genotyping) <sup>a</sup>	rtPCR (HRM-Eva Green)	5'-TGTGCAACTTTAGGAGCTGAGTTC-3' 5'-GCTCTTGACCAGTTTACGCCAATA-3'	60	(22)
<i>E. coli</i> ( <i>eaeA</i> )	PCR	5'-TCAATGCAGTCCGTTATCAGTT-3' 5'-GTAAAGTCCGTTACCCCAACCTG-3'	55	(28)
<i>E. coli</i> ( <i>stx-1</i> ) <sup>b</sup>	rt PCR (Sybr Green)	5'-CATTACAGACTATTCATCAGGAGTA-3' 5'-TCGTTCAACAATAAGCCGTAGATTA-3'	55	(29)
<i>E. coli</i> ( <i>stx-2</i> ) <sup>b</sup>	PCR	5'-CTTCGGTATCCTATTCGCGG-3' 5'-CTGCTGTGACAGTGACAAAACGC-3'	55	(28)
NDV	RT-rtPCR (TaqMan probe)	5'-AGTGATGTGCTCGGACCTTC-3' 5'-CCTGAGGAGAGGCATTGCTA-3' 5'-(6FAM)TTCTTAGCAGTGGGACAGCCTGC-BHQ1-3'	60	(25)
<i>Salmonella</i> spp.	rtPCR (TaqMan probe)	5'-GTGAAATTATCGCCACGTCGGGCAA-3' 5'-TCATCGCACGTCAAAGGAACC-3' 5'-(6FAM)CTCTGGATGGTATGCCGGTAAACA-BHQ1-3'	60	(26)

<sup>a</sup>Only applied in positive samples for *C. psittaci* detection.

<sup>b</sup>Only applied in positive samples for *eaeA* detection.

(*eaeA*) (27, 28). Positive samples for the *eaeA* gene were analysed to assess the presence of *stx-1* (29) and *stx-2* (28). If the sample was positive for at least one of them, it was considered enterotoxigenic (STEC) strain, but if the sample was negative for both genes, it was considered enteropathogenic (EPEC) (20, 27). Primers, probes, and methodology are summarised in Table 2.

### 2.3. Statistical analysis

A non-parametric test (Mann-Whitney *U*-test) was applied to establish differences between monk parakeets and rose-ringed parakeets in the presence of each agent. Statistics were carried out using a commercially available software application (SPSS 29.0 software package; SPSS Inc., Chicago, IL, USA, 2002).

## 3. Results

In total, 81 birds were included in the study: 21 monk parakeets and 60 rose-ringed parakeets. Among monk parakeets, 23.8% were positive for *C. psittaci* (5/21; CI 95% 5.6–42.0%). The results of partial *ompA* gene sequencing revealed that positive samples could be classified as B, E, or E/B genotypes. No positive rose-ringed parakeets were detected for *C. psittaci* ( $p < 0.001$ ). AIVs and NDVs were detected only in rose-ringed parakeets: 13.3% were positive for AIV (8/60; CI 95% 4.7–21.9%) and 3.3% for NDV (2/60; CI 95% 0.0–7.9%). Regarding *E. coli* presence, 9.5% of the monk parakeets were positive for

TABLE 3 Results after analysis in search of the different infectious agents in both invasive species (*Myiopsitta monachus* and *Psittacula krameri*): number of positive birds, percentage from the analysed population for each agent, and interval confidence at 95% level.

Infectious agents	<i>Myiopsitta monachus</i>	<i>Psittacula krameri</i>
AIV	0	8 (13.3%; 95%CI: 4.7–22.0%)
<i>Chlamydophila psittaci</i>	5 (23.8%; 95%CI: 5.6–42.0%)	0
<i>Campylobacter jejuni</i>	0	0
EPEC	2 (9.5%; 95%CI: 0.0–22.1%)	9 (15.0%; 95%CI: 6.0–24.0%)
NDV	0	2 (3.3%; 95%CI: 0.0–7.9%)
<i>Salmonella</i> spp.	0	0

the intimin (*eaeA*) gene (2/21; CI 95% 0.0–22.1%), while the prevalence of this gene in rose-ringed parakeets was slightly higher (15%; 9/60; CI 95% 6.0–24%). All positive samples to *eaeA* were analysed for *stx-1* and *stx-2* genes, all of which were negative and therefore enteropathogenic strains (EPEC). All samples were negative for *Campylobacter jejuni* and *Salmonella* spp. (Table 3).

None of the birds showed clinical signs compatible with those pathogens, so positive birds were considered asymptomatic carriers.

## 4. Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study of potentially zoonotic bacterial and viral agents present in invasive Psittacidae living in urban areas. The results demonstrate that invasive species, namely monk parakeets and rose-ringed parakeets, can host zoonotic pathogens such as *Chlamydia psittaci*, AIV, NDV, or EPEC.

### 4.1. Discussion about pathogens

#### 4.1.1. *Chlamydia psittaci*

The prevalence of *C. psittaci* detected in monk parakeets was in concordance with previous studies with captive individuals of the same species (30). However, although the results are similar, it is important to consider that the habitat conditions are not the same. In contrast to our results, *C. psittaci* was also described in rose-ringed parakeets in previous studies with different prevalence trends, but none of those studies employed specific PCR for *C. psittaci* detection (31, 32). Among the *Chlamydia* genotypes described for birds, all authors agree that genotype A is the most prevalent in Psittacidae (33, 34), while genotypes B, E, and E/B are more common in pigeons (35–37). To the best of our knowledge, this is the first *C. psittaci* genotyping in monk parakeets worldwide. The presence of genotypes B, E, or E/B in monk parakeets suggests that bacteria have been transmitted from pigeons to parakeets in the opposite direction than expected. The different prevalence trends between monk and rose-ringed parakeets could be due to the feeding behaviour of each species and, thus, their interactions with other species. While monk parakeets feed mostly on the ground (38), rose-ringed parakeets do so in trees more frequently (39). Feeding on the ground gives monk parakeets the chance to interact with feral pigeons and then share pathogens with them, mainly respiratory ones. *C. psittaci* is highly prevalent in pigeons from Madrid (10), magnifying the transmission between pigeons and monk parakeets. To confirm this hypothesis, several approaches could be attempted. One approach could be to demonstrate the presence of *C. psittaci* in pigeons from Seville. The other approach could be to genotype positive samples from pigeons. In this sense, previously unpublished results obtained by our research group confirmed the presence of genotypes B, E, and B/E in pigeons from Madrid, which are those found in the present study, supporting this hypothesis. However, a strong phylogenetic analysis such as sequencing the full *ompA* gene is required to demonstrate this potential transmission.

#### 4.1.2. Avian influenza virus

Information about avian influenza in monk and rose-ringed parakeets is scarce. To the best of our knowledge, the present study is the first one conducted on urban free-living birds. In monk parakeets, only one study assessed the presence of AIV by hemagglutination assay in a monk parakeet imported to Austria with a negative result (47). In rose-ringed parakeets, two positive captive birds for H9N2 strains were reported during routine virologic diagnosis of the birds imported to Japan (48).

Unfortunately, in our study, assays for the identification of highly pathogenic AIV (i.e., H5 or H7 variants) could not be attempted due to the limited amount of sample.

#### 4.1.3. Newcastle disease virus

Similarly, the literature on NDV in monk and rose-ringed parakeets is old, and studies were performed using serology assays; therefore, positive samples only confirmed the contact of animals with the virus (49). Other studies focused on Psittacidae showed negative results for NDV detection (50, 51), with the exception of the study of NDV prevalence in India (52), where they found two positive samples out of four Psittaciformes analysed. Unfortunately, no data on which species were analysed were available. The present study confirms the presence of NDV in two rose-ringed parakeets. Unfortunately, the identification of velogenic strains could not be attempted due to the lack of a sample. Both AIV and NDV are notifiable in aviculture due to their serious economic and health repercussions, and wild birds, such as feral pigeons or hybrid ducks (*Anas* spp.), are considered reservoirs of both viruses (10).

#### 4.1.4. *Escherichia coli*

Diarrheagenic *E. coli* (DEC) is one of the main causes of human diarrhoea, and wild birds have been suggested as potential reservoirs for these pathogens (45). Only few articles about DEC detection in monk and rose-ringed parakeets have been published. In 1978, Graham and Graham could not find *E. coli* in the faeces of seven captive monk parakeets by bacteriological culture (46). Our results showed that 9.5% of monk parakeets and 15% of rose-ringed parakeets were positive for EPEC, but none of the strains was classified as STEC. Although there is a disparity, it is hardly comparable because of the publication date, the technique used, and the bird habitat. This represents the first description of EPEC in those Psittacine species.

#### 4.1.5. *Campylobacter jejuni* and *Salmonella* spp.

Finally, only few studies about *Campylobacter jejuni* and *Salmonella* spp. presence have been carried out in monk or rose-ringed parakeets (40–44). Our negative results agree with those published before for both species. However, a study performed on ring-rose parakeets confirmed 67% positivity for *Campylobacter* spp. with PCR detection (41).

### 4.2. General discussion

It is important to highlight that the gregarious behaviour of each species contributes to the spread of pathogens through their ecosystem. Moreover, co-infection has been observed in two rose-ringed parakeets, one of which is positive for AIV and EPEC and the other for AIV and NDV. In conclusion, the present study focuses on pathogens with potential zoonotic effects present in two invasive Psittacidae species and provides an approach to assess their health risk in the ecosystem. The

increase of their populations in urban green zones could represent a hazard to both humans and biodiversity due to their role as reservoirs of zoonotic pathogens. In this context, our results highlight the need for surveillance and monitoring programs for these species.

## Data availability statement

The original contributions presented in the study are included in the article/supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

## Ethics statement

The animal study was reviewed and approved by Universidad Alfonso X El Sabio. Institutional Ethics Committee approval Reference Number: 2023\_3/181.

## Author contributions

JL: experimental design and text writing. MM: style and text revision. CB: sampling and text revision. BM-M and IS: sample lab analysis, results, and statistics. RG: sampling. JO: general revision. FE: experimental design, sample lab analysis, results, and

statistics. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

## Funding

This study has been funded by the City Councils of Madrid and Sevilla.

## Conflict of interest

JL, CB, BM-M, and RG are employed by Servicio de Consultoría para la Recuperación y Ordenación de la Fauna y su Ambiente S.L.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

## References

- Bellard C, Bernery C, Leclerc C. Looming extinctions due to invasive species: Irreversible loss of ecological strategy and evolutionary history Running title: Functional and phylogenetic extinctions due to biological invasions. *Glob Chang Biol*. (2021) 27:4967–79. doi: 10.1111/gcb.15771
- Stuart SN, Chanson JS, Cox NA, Young BE, Rodrigues ASL, Fischman DL, et al. Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*. (2004) 306:1783–6. doi: 10.1126/science.1103538
- Sainsbury AW, Deaville R, Lawson B, Cooley WA, Farelly SSJ, Stack MJ, et al. Poxviral disease in red squirrels *Sciurus vulgaris* in the UK: spatial and temporal trends of an emerging threat. *Ecohealth*. (2008) 5:305–16. doi: 10.1007/s10393-008-0191-z
- Hulme PE. One Biosecurity: A unified concept to integrate human, animal, plant, and environmental health. *Emerg Top Life Sci Portland Press Ltd*. (2020) 4:539–49. doi: 10.1042/ETLS20200067
- Michel V, Ruvoen-Clouet N, Menard A, Sonrier C, Fillonneau C, Rakotovo F, et al. Role of the coypu (*Myocastor coypus*) in the epidemiology of leptospirosis in domestic animals and humans in source. *Eur J Epidemiol*. (2001) 17:111–21. doi: 10.1023/A:1017931607318
- Popielek M, Szczesna-Staskiewicz J, Bartoszewicz M, Okarma H, Smalec B, Zalewski A. Helminth parasites of an introduced invasive carnivore species, the raccoon (*Procyon lotor L.*), from the warta mouth national park (Poland). *J Parasitol*. (2011) 97:357–60. doi: 10.1645/GE-2525.1
- Dyer EE, Redding DW, Blackburn TM. The global avian invasions atlas, a database of alien bird distributions worldwide. *Sci Data*. (2017) 4:170041. doi: 10.1038/sdata.2017.41
- Roy HE, Tricarico E, Hassall R, Johns CA, Roy KA, Scalera R, et al. The role of invasive alien species in the emergence and spread of zoonoses. *Biol Invasions*. (2022) 25:1249–64. doi: 10.1007/s10530-022-02978-1
- Mia MM, Hasan M, Hasnath MR. Global prevalence of zoonotic pathogens from pigeon birds: a systematic review and meta-analysis. *Heliyon*. (2022) 8:e09732. doi: 10.1016/j.heliyon.2022.e09732
- Vázquez B, Esperón F, Neves E, López J, Ballesteros C, Muñoz MJ. Screening for several potential pathogens in feral pigeons (*Columba livia*) in Madrid. *Acta Vet Scand*. (2010) 52:45. doi: 10.1186/1751-0147-52-45
- Andersen MC, Adams H, Hope B, Powell M. Risk assessment for invasive species. *Risk Anal*. (2004) 24:787–93. doi: 10.1111/j.0272-4332.2004.00478.x
- BOE-A-2013-8565. *Disposición 8565 del BOE núm. 185 de 2013*. Madrid: ED. Spanish State (2013).
- Molina B, Postigo JL, Muñoz AR, del Moral JC. *La Cotorra Argentina en España, población reproductora en 2015 y método de censo*. Dissertation. Madrid: ED. SEO/BirdLife (2016).
- del Moral JC, Somoza A, Muñoz AR, Molina B. *La cotorra de Kramer en España, población reproductora en 2015 y método de censo*. Dissertation. Madrid: ED. SEO/BirdLife (2017).
- Nebreda A, Escudero E, del Moral JC. *Censo de Cotorra Argentina en el municipio de Madrid*. Dissertation. Madrid: ED. SEO/BirdLife (2019).
- López R, Ballesteros C, López J. *Memoria final sobre el inventariado y evaluación de nidos de Cotorra Argentina (Myopsitta monachus) en el Parque de las Cruces*. Dissertation. Madrid: ED. SCROFA (2016).
- López R, Ballesteros C, López J. *Memoria final sobre el inventariado y evaluación de nidos de Cotorra Gris Argentina (Myopsitta monachus) en el Parque del Oeste*. Dissertation. Madrid: ED. SCROFA (2016).
- López R, Ballesteros C, López J. *Memoria final sobre el inventariado y evaluación de nidos de Cotorra Argentina (Myopsitta monachus) en los jardines del Campo del Moro*. Dissertation. Madrid: ED. SCROFA (2016).
- López R, Ballesteros C, López J. *Informe sobre la estima poblacional de la Cotorra de Kramer (Psittacula krameri) en el Parque de María Luisa (Sevilla)-Dormidero Avenida de Borbolla*. Dissertation. Sevilla: ED. SCROFA (2019).
- Sacristán C, Esperón F, Herrera-León S, Iglesias I, Neves E, Nogal V, et al. Virulence genes, antibiotic resistance and integrons in *Escherichia coli* strains isolated from synanthropic birds from Spain. *Avian Pathol*. (2014) 43:172–5. doi: 10.1080/03079457.2014.897683

21. Ménard A, Clerc M, Subtil A, Mégraud F, Bébéar C, De Barbeyrac B. Development of a real-time PCR for the detection of *Chlamydia psittaci* [2]. *J Med Microbiol.* (2006) 55:471–3. doi: 10.1099/jmm.0.46335-0
22. Mitchell SL, Wolff BJ, Thacker WL, Ciembor PG, Gregory CR, Everett KDE, et al. Genotyping of *Chlamydia psittaci* by real-time PCR and high-resolution melt analysis. *J Clin Microbiol.* (2009) 47:175–81. doi: 10.1128/JCM.01851-08
23. Best EL, Powell EJ, Swift C, Grant KA, Frost JA. Applicability of a rapid duplex real-time PCR assay for speciation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* directly from culture plates. *FEMS Microbiol Lett.* (2003) 229:237–41. doi: 10.1016/S0378-1097(03)00845-0
24. Spackman E, Senne DA, Myers TJ, Bulaga LL, Garber LP, Perdue ML, et al. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *J Clin Microbiol.* (2002) 40:3256–60. doi: 10.1128/JCM.40.9.3256-3260.2002
25. Wise MG, Suarez DL, Seal BS, Pedersen JC, Senne DA, King DJ, et al. Development of a real-time reverse-transcription pcr for detection of newcastle disease virus RNA in clinical samples. *J Clin Microbiol.* (2004) 42:329–38. doi: 10.1128/JCM.42.1.329-338.2004
26. Malorny B, Bunge C, Helmuth R, A. real-time PCR for the detection of *Salmonella Enteritidis* in poultry meat and consumption eggs. *J Microbiol Methods.* (2007) 70:245–51. doi: 10.1016/j.mimet.2007.04.013
27. Torres-Mejía AM, Blanco-Peña, K, Rodríguez C, Duarte F, Jiménez-Soto M, Esperón F. Zoonotic agents in Feral pigeons (*Columba livia*) from Costa Rica: possible improvements to diminish contagion risks. *Vector Borne Zoonotic Dis.* (2018) 18:49–54. doi: 10.1089/vbz.2017.2131
28. Vidal R, Vidal M, Lagos R, Levine M, Prado V. Multiplex PCR for diagnosis of enteric infections associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* (2004) 42:1787–9. doi: 10.1128/JCM.42.4.1787-1789.2004
29. Chui L, Couturier MR, Chiu T, Wang G, Olson AB, McDonald RR, et al. Comparison of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* detection methods using clinical stool samples. *J Mol Diagn.* (2010) 12:469–75. doi: 10.2353/jmoldx.2010.090221
30. Origlia JA, Cadario ME, Frutos, MC, López NE, Corva S, et al. Detection and molecular characterization of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia abortus* in psittacine pet birds in Buenos aires province, Argentina. *Rev Argent Microbiol.* (2019) 51:130–5. doi: 10.1016/j.ram.2018.04.003
31. Pisanu B, Laroucau K, Aaziz R, Vorimore F, Gros A, le Chapuis JL, et al. *Chlamydia avium* detection from a ring-necked parakeet (*Psittacula krameri*) in France *Chlamydia avium* detection from a ring-necked parakeet (*Psittacula krameri*). *J Exot Pet Med.* (2018) 27:68–74. doi: 10.1053/j.jepm.2018.02.035
32. Chahota R, Katoch RC, Batta MK. Prevalence of *Chlamydia psittaci* among feral birds in himachal Pradesh, India. *J Appl Anim Res.* (1997) 12:89–94. doi: 10.1080/09712119.1997.9706190
33. Sutherland M, Sarker S, Vaz PK, Legione AR, Devlin JM, Macwhirter PL, et al. Disease surveillance in wild Victorian cactuids reveals co-infection with multiple agents and detection of novel avian viruses. *Vet Microbiol.* (2019) 235:257–64. doi: 10.1016/j.vetmic.2019.07.012
34. Vanrompay D, Butaye P, Sayada C, Ducatelle R, Haesebrouck F. Characterization of avian *Chlamydia psittaci* strains using omp1 restriction mapping and serovar-specific monoclonal antibodies. *Res Microbiol.* (1997) 148:327–33. doi: 10.1016/S0923-2508(97)81588-4
35. Andersen AA. Serotyping of *Chlamydia psittaci* isolates using serovar-specific monoclonal antibodies with the microimmunofluorescence test. *J Clin Microbiol.* (1991) 29:707–11. doi: 10.1128/jcm.29.4.707-711.1991
36. Sachse K, Laroucau K, Vanrompay D. Avian chlamydiosis. *Curr Clin Microbiol Rep.* (2015) 2:10–21. doi: 10.1007/s40588-014-0010-y
37. Stokes HS, Berg ML, Bennett ATD, A. Review of chlamydial infections in wild birds. *Pathogens.* (2021) 10:948. doi: 10.3390/pathogens10080948
38. Postigo JL, Carrillo-Ortiz J, Doménech J, Tomás X, Arroyo L, Senar JC. Dietary plasticity in an invasive species and implications for management: the case of the monk parakeet in a Mediterranean city. *Anim Biodivers Conserv.* (2021) 44:185–94. doi: 10.32800/abc.2021.44.0185
39. Fraticelli F. The rose-ringed parakeet *Psittacula krameri* in an urban park: demographic trend, interspecific relationships and feeding preferences (Rome, central Italy). *Avocetta.* (2014) 38:23–8.
40. De Luca C, Niero G, Cattarossi D, Bedin M, Piccirillo A. Pet and captive birds as potential reservoirs of zoonotic bacteria. *J Exot Pet Med.* (2018) 27:17–20. doi: 10.1053/j.jepm.2017.10.017
41. Seifi S, Khoshbakht R, Azizpour A, Seifi S. Occurrence of *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Arcobacter* in pet birds of northern Iran. *J Hellenic Vet Med Soc.* (2019) 17:70. doi: 10.12681/jhvms.22248
42. Lopes ES, Cardoso WM, Albuquerque AH, Teixeira RSC, Salles RPR, Bezerra WGA, et al. Isolation of *Salmonella* spp. in captive Psittaciformes from zoos and a commercial establishment of Fortaleza, Brazil. *Arq Bras Med Vet Zootec.* (2014) 66:965–8. doi: 10.1590/1678-41626643
43. Gonzalez GA. *Estudio serológico de Chlamidia psittaci y Salmonella sp., Virus Pox Aviar, Adenovirus y virus polioma en aves del orden psittaciforme en cautiverio en* Dissertation. Chile: Universidad de Chile (2006).
44. Allgayer MC, Lima-Rosa CA, Weimer TA, Rodenbusch CR, Pereira RA, Streck AF, et al. Molecular diagnosis of *Salmonella* species in captive psittacine birds. *Vet Rec.* (2008) 162:816–9. doi: 10.1136/vr.162.25.816
45. Lopes ES, Maciel WC, Medeiros PHQS, Bona MD, Bindá AH, Lima SVG, et al. Molecular diagnosis of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from *Psittaciformes* of illegal wildlife trade. *Pesqui Vet Bras.* (2018) 38:762–6. doi: 10.1590/1678-5150-pvb-5083
46. Graham CL, Graham DL. Occurrence of *Escherichia coli* in feces of psittacine birds. *Avian Dis.* (1978) 22:717–20. doi: 10.2307/1589649
47. Stunzner D, Thiel W, Pötsch F, Sixl W. Isolation of influenza viruses from exotic and central european birds. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg.* (1980) 247:8–17. doi: 10.1016/S0172-5599(80)80015-0
48. Mase M, Imada T, Sanada Y, Etoh M, Sanada N, Tsukamoto K, et al. Imported parakeets harbor H9N2 influenza A viruses that are genetically closely related to those transmitted to humans in Hong Kong. *J Virol.* (2001) 75:3490–4. doi: 10.1128/JVI.75.7.3490-3494.2001
49. Vijayan V. *Role of Parrots in the Epizootiology of Newcastle Disease*. Thesis. Mannuthy: College of Veterinary and Animal Sciences, Mannuthy (1981).
50. Gilardi KVK, Lowenstine LJ, Gilardi JD, Munn4 CA, A. Survey for selected viral, Chlamydial, and parasitic diseases in wild dusky-headed parakeets (*Aratinga weddellii*) and tui parakeets (*Brotogeris Sanctithomae*) in Peru. *J Wildl Dis.* (1995) 31:523–8. doi: 10.7589/0090-3558-31.4.523
51. Johnson DC, Couvillion CE, Pearson JE. Failure to demonstrate viscerotropic vologenic newcastle disease in psittacine birds in the Republic of the Philippines. *Avian Dis.* (1986) 30:813–5. doi: 10.2307/1590590
52. Bansal N, Singh R, Chaudhary D, Mahajan NK, Joshi VG, Maan S, et al. Prevalence of newcastle disease virus in wild and migratory birds in Haryana, India. *Avian Dis.* (2022) 66:141–7. doi: 10.1637/aviandiseases-D-21-00115

## Bibliografía

AA. VV (2023). Situación actual de la Influenza aviar en los EE.UU. *Centros para el Control y la Prevención de enfermedades*, 1-4.

Abtin, A., Shoushtari, A., Pourbakhsh, S. A., Mehrabadi, F. M. H., & Pourtaghi, H. (2022). Two Novel Avian Influenza Virus Subtypes Isolated from Domestic Ducks in North of Iran. *Archives of Razi Institute*, 77(2), 861–867. <https://doi.org/10.22092/ARI.2021.353411.1603>

Adzitey, F., Rusul, G., & Huda, N. (2012). Prevalence and antibiotic resistance of Salmonella serovars in ducks, duck rearing and processing environments in Penang, Malaysia. *Food Research International*, 45(2), 947–952. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.02.051>

Ahmed, N. A., & Gulhan, T. (2022). Campylobacter in Wild Birds: Is it an Animal and Public Health Concern? *Frontiers in Microbiology*, 12, 1-11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.812591>

Ajene, A. N., Fischer, C. L., & Black, R. E. (2013). Enteric Pathogens and Reactive Arthritis: A Systematic Review of *Campylobacter*, *Salmonella* and *Shigella*-associated Reactive Arthritis. *Journal of Health, Population and Nutrition*, 3, 299-307. <https://doi.org/10.3329/jhpn.v3i1i3.16515>

Alexander, D. J. (2000). A review of avian influenza in different bird species. *Veterinary Microbiology*, 74, 3-13. [https://doi.org/10.1016/s0378-1135\(00\)00160-7](https://doi.org/10.1016/s0378-1135(00)00160-7)

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>

Allgayer, M. C., Lima-Rosa, C. A. V, Weimer, T. A., Rodenbusch, C. R., Pereira, R. A., Streck, A. F., Oliveira, S. D., & Canal, C. W. (2008). Molecular diagnosis of *Salmonella* species in

captive psittacine birds. *Veterinary Record*, 162(25), 816–819.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1136/vr.162.25.816>

Andersen, A. A. (1991). Serotyping of *Chlamydia psittaci* Isolates Using Serovar-Specific Monoclonal Antibodies with the Microimmunofluorescence Test. *Journal of Clinical Microbiology*, 29(4), 707-711. <https://doi.org/10.1128/jcm.29.4.707-711.1991>

Andersen, M. C., Adams, H., Hope, B., & Powell, M. (2004). Risk Assessment for Invasive Species. *Risk Analysis*, 24(4), 787-793. [https://doi.org/0272-4332/04/0100-0787\\$22.00/1](https://doi.org/0272-4332/04/0100-0787$22.00/1)

Awad WA, Hess C, Hess M. (2018). Re-thinking the chicken-*Campylobacter jejuni* interaction: a review. *Avian Pathology*, 47(4), 352-363. doi: 10.1080/03079457.2018.1475724. Epub 2018 Jun 11. PMID: 29764197.

Baigent, S. J., & McCauley, J. W. (2003). Influenza type A in humans, mammals and birds: Determinants of virus virulence, host-range and interspecies. *BioEssays*, 25(7), 657-671. <https://doi.org/10.1002/bies.10303>

Báldi, A. (1999). Microclimate and vegetation edge effects in a reedbed in Hungary. *Biodiversity and Conservation*, 8, 1697-1706. DOI 10.1023/A:1008901514944

Bansal, N., Singh, R., Chaudhary, D., Mahajan, N. K., Joshi, V. G., Maan, S., Ravishankar, C., Sahoo, N., Mor, S. K., Radzio-Basu, J., Kapur, V., Jindal, N., & Goyal, S. M. (2022). Prevalence of Newcastle Disease Virus in Wild and Migratory Birds in Haryana, India. *Avian Diseases*, 66, 141-147. <https://doi.org/10.1637/aviandiseases-d-21-00115>

Beleza, A. J. F., Maciel, W. C., Carreira, A. S., Bezerra, W. G. A., Carmo, C. C., Havt, A., Gaio, F. C., & Teixeira, R. S. C. (2019). Detection of *enterobacteriaceae*, antimicrobial susceptibility, and virulence genes of *Escherichia coli* in canaries (*Serinus canaria*) in northeastern Brazil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 39(3), 201–208. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5829>

Best, E. L., Powell, E. J., Swift, C., Grant, K. A., & Frost, J. A. (2003). Applicability of a rapid duplex real-time PCR assay for speciation of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* directly from culture plates. *FEMS Microbiology Letters*, 229(2), 237–241. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00845-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00845-0)

Blancher, P. (2013). Estimation du nombre d'oiseaux tués par les chats domestiques (*Felis catus*) au Canada. *Avian Conservation and Ecology*, 8(2), 3. <https://doi.org/10.5751/ACE-00557-080203>

Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Rey, J., Alonso, J. M., Hermoso, M., Hermoso, J., Alonso, M. P., Dahbi, G., González, E. A., Bernárdez, M. I., & Blanco, J. (2003). Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(4), 1351–1356. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.4.1351-1356.2003>

BOE (Boletín Oficial del Estado). Real Decreto 630/2013, de 2 de agosto, por el que se regula el Catálogo español de especies exóticas invasoras, 3 de agosto de 2013.

Bolsinger, M. & Flückiger, W. (1989). Ambient air pollution induced changes in amino acid pattern of Phloem sap in host plants-relevance to aphid infestation. *Environmental Pollution*, 56, 209-216. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(89\)90038-9](https://doi.org/10.1016/0269-7491(89)90038-9)

Boonmar, S., Yingsakmongkon, S., Songserm, T., Hanhaboon, P. & Passadurak, W. (2007). Detection of campylobacter in duck using standar culture method and multiplex polymerase chain reaction. *Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 38(4), 728-731.

Brown, J. D., Berghaus, R. D., Costa, T. P., Poulson, R., Carter, D. L., Lebarbenchon, C., & Stallknecht, D. E. (2012). Intestinal excretion of a wild bird-origin H3N8 low pathogenic avian influenza virus in mallards (*Anas platyrhynchos*). *Journal of wildlife diseases*, 48(4), 991-998. <http://dx.doi.org/10.1637/10158-040912-Reg.1>

Busquets, N., Alba, A., Napp, S., Sánchez, A., Serrano, E., Rivas, R., Núñez, J., & Majó, N. Influenza A virus subtypes in wild birds in North-Eastern Spain (Catalonia). *Virus Research*, 149(1), 10-18. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.12.005>

Cabrita, J., Rodrigues, J., Braganca, F., Morgado, C., Pires, I., & Goncalves, A.. (1992). Prevalence, biotypes, plasmid profile and antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolate from wild and domestic animals from Northeast Portugal. *Journal of Applied Bacteriology*, 73(4), 279-285. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb04978.x>.

Causey, D., & Edwards, S. V. (2008). Ecology of avian influenza virus in birds. *Journal of Infectious Diseases*, 197(1), 29-33. <https://doi.org/10.1086/524991>

Chace, J. F., & Walsh, J. J. (2006). Urban effects on native avifauna: A review. *Landscape and Urban Planning*, 74(1), 46–69. <https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2004.08.007>

Chahota, R., Katoch, R. C., & Batta, M. K. (1997). Prevalence of *Chlamydia psittaci* among feral birds in himachal pradesh, india. *Journal of Applied Animal Research*, 12(1), 89–94. <https://doi.org/10.1080/09712119.1997.9706190>

Cheong, H. C., Lee, C. Y. Q., Cheok, Y. Y., Tan, G. M. Y., Looi, C. Y., & Wong, W. F. (2019). *Chlamydiaceae*: Diseases in primary hosts and zoonosis. *Microorganisms*, 7(5). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050146>

Choi, I. S., & Song, C. S. (2012). Exchange of Newcastle disease viruses in Korea: The relatedness of isolates between wild birds, live bird markets, poultry farms and neighboring countries. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), 478–482. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.004>

Chui, L., Couturier, M. R., Chiu, T., Wang, G., Olson, A. B., McDonald, R. R., Antonishyn, N. A., Horsman, G., & Gilmour, M. W. (2010). Comparison of Shiga toxin-producing

*Escherichia coli* detection methods using clinical stool samples. *Journal of Molecular Diagnostics*, 12(4), 469–475. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2010.090221>

Colles, F. M., Ali, J. S., Sheppard, S. K., McCarthy, N. D., & Maiden, M. C. J. (2011). *Campylobacter* populations in wild and domesticated Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*). *Environmental Microbiology Reports*, 3(5), 574–580. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2011.00265.x>

Cong, W., Huang, S. Y., Zhang, X. Y., Zhou, D. H., Xu, M. J., Zhao, Q., Song, H. Q., Zhu, X. Q., & Qian, A. D. (2013). Seroprevalence of *Chlamydia psittaci* infection in market-sold adult chickens, ducks and pigeons in north-western China. *Journal of Medical Microbiology*, 62(8), 1211–1214. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.059287-0>

Cornelis, J., & Hermy, M. (2004). Biodiversity relationships in urban and suburban parks in Flanders. *Landscape and Urban Planning*, 69(4), 385–401. <https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2003.10.038>

Costa, T. P., Brown, J. D., Howerth, E. W., Stallnecht, D. E., & Swayne, D. E. (2021). Homo- and Heterosubtypic Low Pathogenic Avian Influenza Exposure on H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus infection in Wood Ducks (*Aix sponsa*). *PLOS ONE*, 6(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015987>

Cranz, G., & Boland, M. (2004). Defining the Sustainable Park: A Fifth Model for Urban Parks. *Landscape Journal*, 23(2), 102–120. <https://doi.org/10.3368/lj.23.2.102>

Cracraft, J., & Barker, K. (2009). *Passerine birds (Passeriformes)*. The Timetree of Life. Oxford University Press, 423–431. <https://doi.org/10.1093/oso/9780199535033.003.0061>

Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4), 822–880. <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13>

Dashe YG, Raji MA, Abdu PA, Oladele BS, Olarinmoye D (2014). Isolation of *Aeromonas hydrophila* from commercial chickens in Jos metropolis, Nigeria. *International Journal of Poultry Science*, 13, 26–30. <https://doi.org/10.3923/ijps.2014.26.30>.

Daszak, P., Cunningham, A. A., & Hyatt, A. D. (2000). Emerging Infectious Diseases of Wildlife-Threats to Biodiversity and Human Health. *Science`s Compass*, 287(21), 443-449. <https://doi.org/10.1126/science.287.5452.443>

De las Nieves, D., Percedo, M.A., Rodríguez, S. V., Fonseca, O., Centelles, Y., Ley, O., Abreu, Y, Delgado, B., Capdevila, Y., Santoro, K. R., Quesada, T., Peláez, M & Alfonso, P. (2020). Influenza aviar. Oportunidades de mejora del sistema de vigilancia activa basado en riesgo en Cuba. *Revista de Salud Animal*, 42(3), 2224-4700.

De Luca, C., Niero, G., Cattarossi, D., Bedin, M., & Piccirillo, A. (2018). Pet and captive birds as potential reservoirs of zoonotic bacteria. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 27(1), 17–20. <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2017.10.017>

De Marco, M. A., Foni, E., Campitelli, L., Raffini, E., Delogu, M., & Donateelli, I. (2003). Long-term Monitoring for Avian Influenza Viruses in Wild Bird Species in Italy. *Veterinary Research Communications*, 1, 107-114. <https://doi.org/10.1023/b:verc.0000014126.72654.22>

Dekker, J. P., & Frank, K. M. (2015). *Salmonella*, *Shigella*, and *Yersinia*. *Clinics in Laboratory Medicine*, 35(2), 225–246. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.02.002>

Del Moral, J. C., Somoza, A., Muñoz, A. R., & Molina, B. (2017). *La cotorra de Kramer en España, población reproductora en 2015 y método de censo*. SEO/BirdLife.

Dong, N., Yang, X., Wai-Chi Chan, E., Zhang, R., & Chen, S. (2022). *Kebsiella* species: Taxonomy, hypervirulence and multidrug resistance. *The Lancet*, 79, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.103998>

Donnenberg, M. S. (2000). Pathogenic strategies of enteric bacteria. *Nature*, 406(6797), 768-764. <https://doi.org/10.1038/35021212>

Duim, B., Vandamme, P. A. R., Rigter, A., Laevens, S., Dijkstra, J. R., & Wagenaar, J. A. (2001). Differentiation of *Campylobacter* species by AFLP fingerprinting. *Microbiology*, 147, 2729-2737. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-10-2729>

Edelaar, P., Roques, S., Hobson, E. A., Gonçalves da Silva, A., Russello, M. A., Senar, J. C., Wright, T. F., & Carrete, M. (2015). Shared genetic diversity across the global invasive range of the Monk parakeet suggests a common restricted geographic origin and the possibility of convergent selection. *Molecular Ecology*, 24(9), 2164-2176. <https://doi.org/10.1111/mec.13157>.

EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control). (2023). The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 21(12), e8442. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8442>

Esperón, F., Elvira, E., Vázquez, B., Neves, E., Nogal, V., Muñoz, M.J. (2012) Serotyping *Chlamydophila psittaci* in feral pigeons by high resolution melting analysis (HRM). *61st International conference of the WDA and the 10th biennial conference of the EWDA Lyon (France)*, 22-27.

Esperón, F., Vázquez, B., Sánchez, A., Fernández-Piñero, J., Yuste, M., Neves, E., Nogal, V., & Muñoz, M. J. (2014). Seroprevalence of paramyxoviruses in synanthropic and semi-free-range birds. *Avian Diseases*, 58(2), 306-308. <https://doi.org/10.1637/10689-101113->

Ewers, C., Guenther, S., Wieler, L. H., & Schierack, P. (2009). (n.d.). Mallard ducks- a waterfowl species with high risk of distributing *Escherichia coli* pathogenic for humans. *Environmental Microbiology Reports*, 1(6), 510-517. <https://doi.org/10.1111/j.1758.2229.2009.00058.x>

Faiza, N., Saleha, S., Jalila, A. A., & Fauziah, A. (2013). Occurrence of *Campylobacter* and *Salmonella* in ducks and duck eggs in Selangor, Malaysia. *Tropical Biomedicine*, 30(1), 155-158.

Fernández-Juricic, E. (2001). Avian spatial segregation at edges and interiors of urban parks in Madrid, Spain. In *Biodiversity and Conservation*, 10, 13-21. DOI 10.1023/A:1016614625675

Fernández-Juricic, E., & Tellería, J. L. (2000). Effects of human disturbance on spatial and temporal feeding patterns of blackbird *Turdus merula* in urban parks in Madrid, Spain. *Bird Study*, 47(1), 13–21. <https://doi.org/10.1080/00063650009461156>

Flandrois JP, Perrière G, Gouy M. (2015). leBIBIQBPP: a set of databases and a webtool for automatic phylogenetic analysis of prokaryotic sequences. *BMC Bioinformatics*; 16, 251. <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0692-z>

Foti, M., Rinaldo, D., Guercio, A., Giacobello, C., Aleo, A., De Leo, F., Fisichella, V., & Mammina, C. (2011). Pathogenic microorganisms carried by migratory birds passing through the territory of the island of Ustica, Sicily (Italy). *Avian Pathology*, 40(4), 405-409. <https://doi.org/10.1080/03079457.2011.588940>

Fraeyman, A., Boel, A., Van Vaerenbergh, K., & De Beenhouwer, H. (2010). Atypical pneumonia due to *Chlamydophila psittaci*: 3 Case reports and review of literature. *Acta Clinica Belgica*, 65(3), 192–196. <https://doi.org/10.1179/acb.2010.040>

Fratamico, P. M., DebRoy, C., Liu, Y., Needleman, D. S. Baranzoni, G. M., & Feng, P. (2016) Advances in Molecular serotyping and Subtyping of *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1-8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00644>

Fratlicelli, F. (2014). The rose-ringed parakeet *Psittacula krameri* in a urban park: demographic trend, interspecific relationships and feeding preferences (Rome, central Italy). *Avocetta*, 38, 23-28.

Fredriksson-Ahomaa M. (2019). Wild Boar: A Reservoir of Foodborne Zoonoses. *Foodborne Pathogens and Diseases*, 16(3):153-165. <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2512>.

Fuller, T. L., Saatchi, S. S., Curd, E. E., Thomassen, H. A., Buermann, W., & Smith, T. B. (2010). Mapping the risk of avian influenza in wild birds in the US. *BMC Infectious Diseases*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2334-10-187>

García, F. J., Abad, J. C., Serrano, T., Frías, N., Castro, M., & Lorente, S. (2013.). *Epidemiología de Campylobacter en avicultura*. Congreso Científico de Avicultura.

Galán, J. C. (coord.). (2012). Diagnóstico microbiológico de las infecciones por *Chlamydia spp.* y especies relacionadas. *Seimc*, 44.

Garmendia, J., Frankel, G., & Crepin, V. F. (2005). Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: Translocation, translocation, translocation. In *Infection and Immunity*, 73(5), 2573–2585. <https://doi.org/10.1128/IAI.73.5.2573-2585.2005>

Garcia ME, Doménech A, Domínguez L, Ramiro F, Fernández-Garayzábal JF. (1992) *Aeromonas hydrophila* conjunctivitis in a pet parrot (*Amazona versicolor*). *Avian Diseases*, 36, 1110–1111. <https://doi.org/10.2307/1591585>.

Garrido, P., Blanco, M., Moreno-Paz, M., Briones, C., Dahbi, G., Blanco, J., Blanco, J., & Parro, V. (2006). STEC-EPEC oligonucleotide microarray: A new tool for typing genetic variants of the LEE pathogenicity island of human and animal Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strains. *Clinical Chemistry*, 52(2), 192–201. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.059766>

Gaston, J. S., & Lillicrap, M. S. (2003) Arthritis associated with enteric infection. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 17(2), 219-239. [https://doi.org/10.1016/s1521-6942\(02\)00104-3](https://doi.org/10.1016/s1521-6942(02)00104-3)

Gerlach H, Bitzer K (1971). Infection with *Aeromonas hydrophila* in young turkeys. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 78, 593–608.

Gilardi, K. V. K., Lowenstine, L. J., Gilardi, J. D., & Munn4, C. A. (1995). A Survey for selected viral, *Chlamydial*, and parasitic diseases in wild dusky-headed parakeets (*Aratinga weddellii*) and tui parakeets (*Brotogeris Sanctithomae*) in Peru. *Journal of Wildlife Diseases*, 31(4), 523-528. DOI 10.7589/0090-3558-31.4.523

Glunder G. (1989). Occurrence of *Aeromonas hydrophila* in finches and psittacines. *Kleintierpraxis*, 34, 33–34.

Gonzalez, G. A. (2006). *Estudio serológico de Chlamidia psittaci y Salmonella sp., Virus Pox Aviar, Adenovirus y virus polioma en aves del orden psittaciforme en cautiverio en Chile Central*. Universidad de Chile.

Graham, C. L., & Graham, D. L. (1978). Occurrence of *Escherichia coli* in Feces of Psittacine Birds. *Avian Diseases*, 22(4), 717-720. <https://doi.org/10.2307/1589649>

Gruffydd-Jones, & Lloret, A. (2009). The process of evidence-based medicine. In *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11(7), 529. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2009.05.001>

Hanski I, von Hertzen L, Fyhrquist N, Koskinen K, Torppa K, Laatikainen T, Karisola P, Auvinen P, Paulin L, Mäkelä MJ, Vartiainen E, Kosunen TU, Alenius H, Haahela T. (2012). Environmental biodiversity, human microbiota, and allergy are interrelated. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A.*, 109(21), 8334-9. doi: 10.1073/pnas.1205624109.

Hassell JM, Begon M, Ward MJ, Fèvre EM. (2017). Urbanization and Disease Emergence: Dynamics at the Wildlife-Livestock-Human Interface. *Trends in Ecology & Evolution*, 32(1), 55-67. doi: 10.1016/j.tree.2016.09.012.

Heeney, J. L. (2006). Zoonotic viral diseases and the frontier of early diagnosis control and prevention. *Journal of Internal Medicine*, 260(5), 399–408. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2006.01711.x>

Hegazy, A. M., El-Sisi, M. A., Hadia, A. A., & Hala, M.N. T. (2014). Incidence of *Chlamydia psittaci* in domestic Birds in Sharkia Governatore, Egipt. *Zagazig. Veerinary. Journal*, 42(3), 67-76. <https://doi.org/10.21608/zvzj.2014.60047>

Herrmann, B., Persson, H., Jensen, J.-K., Debes Joensen, H., Klint, M., & Olsen, B. (2006). *Chlamydophila psittaci* in Fulmars, the Faroe Islands. *Emerging Infectious Diseases*, 12(2), 330-332. <https://doi.org/10.3201/eid1202.050404>

Hogerwerf L, Roof I, de Jong MJK, Dijkstra F, van der Hoek W. (2020). Animal sources for zoonotic transmission of psittacosis: a systematic review. *BMC Infectious Diseases*, 4;20(1), 192. doi: 10.1186/s12879-020-4918-y.

Horn, R. V., Cardoso, W. M., Lopes, E. S., Teixeira, R. S. C., Albuquerque, Á. H., Rocha-e-Silva, R. C., Machado, D. N., & Bezerra, W. G. A. (2015). Identification and antimicrobial resistance of members from the *Enterobacteriaceae* family isolated from canaries (*Serinus canaria*). *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 35(6), 552–556. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2015000600011>

Hulin, V., Oger, S., Vorimore, F., Aaziz, R., de Barbeyrac, B., Berruchon, J., Sachse, K., & Laroucau, K. (2015). Host preference and zoonotic potential of *Chlamydia psittaci* and *C. gallinacea* in poultry. *Pathogens and Disease*, 73(1), 1–11. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftv005>

Hulme, P. E. (2021). One Biosecurity: A unified concept to integrate human, animal, plant, and environmental health. *Emerging Topics in Life Sciences*, 4(5), 539–549. <https://doi.org/10.1042/ETLS20200067>

Jackson, H., Strubbe, D., Tollington, S., Prys-Jones, R., Matthysen, E., & Groombridge, J. J. (2015). Ancestral origins and invasion pathways in a globally invasive bird correlate with climate and influences from bird trade. *Molecular Ecology*, 24(16), 4269–4285. <https://doi.org/10.1111/mec.13307>

Jamali, H., Ghaderpour, A., Radmehr, B. Chuan wei, K. S., Ching, C. L. & Ismail, S. (2014a). Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter* species isolates in ducks and geese. *Food Control*, 50, 328-330. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.09.016>

Jamali, H., Radmehr, B., & Ismail, S. (2014b). Prevalence and antimicrobial resistance of *Listeria*, *Salmonella*, and *Yersinia* species isolates in ducks and geese. *Poultry Science*, 93(4), 1023–1030. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03699>

Jiang L, Hu X, Xu T, Zhang H, Sheng D, Yin D. (2013). Prevalence of antibiotic resistance genes and their relationship with antibiotics in the Huangpu River and the drinking water sources, Shanghai, China. *Science of Total Environment*, 458, 267-272. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.038>

Jindal N, Garg SR, Kumar A (1993) Comparison of *Aeromonas* species isolated from human, livestock and poultry faces. *Israel Journal of Veterinary Medicine*, 48, 80–83.

Johnson, D. C., Couvillion, C. E., & Pearson, J. E. (1985). Failure to Demonstrate Viscerotropic Velogenic Newcastle Disease in Psittacine Birds in the Republic of the Philippines. *Avian Diseases*, 30(4). 813-815. <https://doi.org/10.2307/1590590>

Jokimäki, J., & Suhonen, J. (1998). Distribution and habitat selection of wintering birds in urban environments. *In Landscape and Urban Planning*, 39, 253-263. [https://doi.org/10.1016/s0169-2046\(97\)00089-3](https://doi.org/10.1016/s0169-2046(97)00089-3)

Kaleta, E. F., & Docherty, D. E. (2007). Avian herpesviruses. *Infectious diseases of wild birds*, 63-86. DOI 10.1002/9780470344668.ch3

Keesing F, Belden LK, Daszak P, Dobson A, Harvell CD, Holt RD, Hudson P, Jolles A, Jones KE, Mitchell CE, Myers SS, Bogich T, Ostfeld RS. (2010). Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature*, 468(7324), 647-52. doi: 10.1038/nature09575.

Khalafi, E., Boroomand, Z., Mayahi, M., & Seyfi Abad Shapoui, M. R. (2023). Investigation of Newcastle Disease Virus Infection in Pet Birds in the Southwest of Iran. *Archives of Razi Institute*, 78(4), 1260. <https://doi.org/10.22092/ari.2023.361726.2675>

Kim, B. Y., Lee, D. H., Kim, M. S., Jang, J. H., Lee, Y. N., Park, J. K., Yuk, S. S., Lee, J. B., Park, S., Choi, I., & Song, C. (2012) Exchange of Newcastle disease viruses in Korea: The relatedness of isolates between wild birds, live bird markets, poultry farms and neighboring countries. *Infection, Genetics and Evolution*, 12(2), 478-482. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.004>

Kim, H., Lee, J., Jang, Y., Chang, B., Kim, A., & Choe, N. (2016). Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. and *Escherichia coli* isolated from ducks in Korea. *Korean Journal of Veterinary Research*, 56(2), 91–95. <https://doi.org/10.14405/kjvr.2016.56.2.91>

Knittler, M. R., & Sachse, K. (2015). *Chlamydia psittaci*: Update on an underestimated zoonotic agent. *Pathogens and Disease*, 73(1). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftu007>

Krawiec, M., Piasecki, T., & Wieliczko, A. (2015). Prevalence of *Chlamydia psittaci* and Other *Chlamydia* Species in Wild Birds in Poland. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 15(11), 652–655. <https://doi.org/10.1089/vbz.2015.1814>

Lebarbenchon, C., Chang, C.-M., Grandhomme, V., Dietrich, M., Kayser, Y., Elguero, E., Renaud, F., Thomas, F., Van Der Werf, S., & Gauthier-Clerc, M. (2010.). Avian Influenza Circulation in the Camargue (South of France) During the 2006-07 Season. *Avian Diseases*, 54, 446-449. <https://doi.org/10.1637/9061-866509-digest.1>

Lee, E., Jeon, W., Kwon, J., Yang, C., & Choi, K. (2009). Molecular epidemiological investigation of Newcastle disease virus from domestic ducks in Korea. *Veterinary Microbiology*, 134(3-4), 241-248. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.08.020>.

Li, C., Yu, M., Liu, L., & Sun, H. (2016). Characterization of a novel H3N2 influenza virus isolated from domestic ducks in China. *Virus Genes*, 52(4), 568–572. <https://doi.org/10.1007/s11262-016-1323-0>

Linton, A. H., & Hinton, M. (1988). *Enterobacteriaceae* associated with animals in health and disease. *Journal of Applied Bacteriology*, 65, 71-85. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1988.tb04646.x>.

Lopes, E. S., Cardoso, W. M., Albuquerque, Á. H., Teixeira, R. S. C., Salles, R. P. R., Bezerra, W. G. A., Rocha e Silva, R. C., Lima, S. V. G., Sales, R. J. P. F., & Vasconcelos, R. H. (2014). Isolation of *Salmonella spp.* in captive Psittaciformes from zoos and a commercial establishment of Fortaleza, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*, 66(3), 965–968. <https://doi.org/10.1590/1678-41626643>

Lopes, E. S., Maciel, W. C., Medeiros, P. H. Q. S., Bona, M. D., Bindá, A. H., Lima, S. V. G., Gaio, F. C., & Teixeira, R. S. C. (2018). Molecular diagnosis of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from Psittaciformes of illegal wildlife trade. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 38(4), 762–766. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5083>

López, R., Ballesteros, C., & López, J. (2016a). *Memoria final sobre el inventariado y evaluación de nidos de Cotorra Argentina (Myopsitta monachus) en el Parque de las Cruces (Madrid)*. SCROFA S. L.

López, R., Ballesteros, C., & López, J. (2016b). *Memoria final sobre el inventariado y evaluación de nidos de Cotorra Argentina (Myopsitta monachus) en los jardines del Campo del Moro (Madrid)*. SCROFA S. L.

López, R., Ballesteros, C., & López, J. (2016c). *Memoria final sobre el inventariado y evaluación de nidos de Cotorra Gris Argentina (Myopsitta monachus) en el Parque del Oeste (Madrid)*. SCROFA S. L.

López, R., Ballesteros, C., & López, J. (2019). *Informe sobre la estima poblacional de la cotorra de Kramer (Psittacula krameri) en el Parque de María Luisa (SEVILLA)-Dormidero Avenida de Borbolla*. SCROFA S. L.

López, R., Ballesteros, C., & López, J. (2022). *Informe sobre las Aves Silvestres del Parque del Oeste (Madrid)*. SCROFA S. L.

Madani, S. A., & Peighambari, S. M. (2013). PCR-based diagnosis, molecular characterization and detection of atypical strains of avian *Chlamydia psittaci* in companion and wild birds. *Avian Pathology*, 42(1), 38–44.

<https://doi.org/10.1080/03079457.2012.757288>

Magnino, S., Haag-Wackemagel, D., Geigenfeind, I., Helmecke, S., Dovc, A., Pruckner-Radovic, E., Residbegovic, E., Ilieski, V., Laroucau, K., & Donati, M. (2009). Chlamydial infections in feral pigeons in Europe: Review of data and focus on public health implications. *Veterinary Microbiology*, 135(1-2), 54.

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.045.hal-00532496>.

Malorny, B., Bunge, C., & Helmuth, R. (2007). A real-time PCR for the detection of *Salmonella Enteritidis* in poultry meat and consumption eggs. *Journal of Microbiological Methods*, 70(2), 245–251. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.04.013>

Man, S. M. (2011). The clinical importance of emerging *Campylobacter* species. In *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, 8(12), 669–685. <https://doi.org/10.1038/nrgastro.2011.191>

Marcacci G, Westphal C, Wenzel A, Raj V, Nölke N, Tschardt T, Grass I. (2021). Taxonomic and functional homogenization of farmland birds along an urbanization gradient in a tropical megacity. *Global Change Biology*, 20. 4980-4994. doi: 10.1111/gcb.15755.

Martín-Maldonado, B. (2021). *Detección y epidemiología de Salmonella spp. en aves silvestres en la Península Ibérica*. Universidad Complutense de Madrid.

Mase, M., Imada, T., Sanada, Y., Etoh, M., Sanada, N., Tsukamoto, K., Kawaoka, Y., & Yamaguchi, S. (2001). Imported Parakeets Harbor H9N2 Influenza A Viruses That Are Genetically Closely Related to Those Transmitted to Humans in Hong Kong. *Journal of Virology*, 75(7), 3490–3494. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.7.3490-3494.2001>

Mcelnea, C. L., & Cross, G. M. (1999). Methods of detection of *Chlamydia psittaci* in domesticated and wild birds. *Australian Veterinary Journal*, 77(8), 516-521. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1999.tb12123.x>

McGuigan, C. C., McIntyre, P. G., & Templeton, K. (2011). Psittacosis outbreak in Tayside, Scotland, December 2011 to February 2012. *Euro Surveill*, 17(22), 1-3. <https://doi.org/10.2807/ese.17.22.20186-en>

Ménard, A., Clerc, M., Subtil, A., Mégraud, F., Bébéar, C., & De Barbeyrac, B. (2006). Development of a real-time PCR for the detection of *Chlamydia psittaci*. *Journal of Medical Microbiology*, 55(4), 471–473. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46335-0>

Merck (Ed.). (2022). Manual Veterinario de Merck. *Oceano*.

Michel, V., Ruvoen-Clouet, N., Menard, A., Sonrier, C., Fillonneau, C., Rakotovao, F., Ganière, J. P., & André-Fontaine, G. (2001). Role of the Coypu (*Myocastor coypus*) in the Epidemiology of Leptospirosis in Domestic Animals and Humans. *Source: European Journal of Epidemiology*, 17(2), 175-181. DOI 10.1023/A:1017931607318

Mina, A., Fatemeh, A., & Jamshid, R. (2019). Detection of *Chlamydia psittaci* Genotypes Among Birds in Northeast Iran. *Journal of Avian Medicine and Surgery*, 33(1), 22-28. <https://doi.org/10.1647/2017-334>

Mitchell, S. L., Wolff, B. J., Thacker, W. L., Ciembor, P. G., Gregory, C. R., Everett, K. D. E., Ritchie, B. W., & Winchell, J. M. (2009). Genotyping of *Chlamydia psittaci* by real-time PCR and high-resolution melt analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 47(1), 175–181. <https://doi.org/10.1128/JCM.01851-08>

Molina, B., Postigo, J. L., Muñoz, A. R., & Del Moral, J. C. (2016). *La cotorra argentina en España, población reproductora en 2015 y método de censo*. SEO/BirdLife.

Molina, B., Nebreda, A., Muñoz, A. R., Seoane, J., Real, R., Bustamante, J. y Del Moral, J. C. (2022). *III Atlas de aves en época de reproducción en España*. SEO/BirdLife.

Mora, A., Blanco, M., Yamamoto, D., Dahbi, G., Blanco, J. E., López, C., Alonso, M. P., Vieira, M. A. M., Hernandez, R. T., Abe, C. M., Piazza, R. M. F., Lacher, D. W., Elias, W. P., Gomes, T. A. T., & Blanco, J. (2009). HeLa-cell adherence patterns and actin aggregation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin-producing *E. coli* (STEC) strains carrying different eae and tir alleles. *International Microbiology*, 12(4), 243–251. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.104>

Nebreda, A., Escudero, E., & Del Moral, J. C. (2019). *Censo de cotorra argentina en el municipio de Madrid 2019*. SEO/BirdLife.

Needham JR, Kirkwood JK, Cooper JE. (1979). A survey of aerobic bacteria in droppings of captive birds of prey. *Research in Veterinary Science*, 27, 125–126. [https://doi.org/10.1016/s0034-5288\(18\)32873-x](https://doi.org/10.1016/s0034-5288(18)32873-x).

Niskanen, T., Waldenström, J., Fredriksson-Ahomaa, M., Olsen, B., & Korkeala, H. (2003). virF-Positive *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* found in Migratory Birds in Sweden. *American Society for Microbiology*, 69(6), 4670-4675. <https://doi.org/10.1128/aem.69.8.4670-4675.2003>

Nonga, H. E., & Muhairwa, A. P. (2009). Prevalence and antibiotic susceptibility of thermophilic *Campylobacter* isolates from free range domestic duck (*Cairina mostacha*) in Morogoro municipality, Tanzania. *Tropical Animal Health and Production*, 42(2), 165-172. <https://doi.org/10.1007/s11250-009-9401-0>

Nzeako B, Okafor N (2002) Bacterial enteropathogens and factors associated with seasonal episodes of gastroenteritis in Nsukka, Nigeria. *Br. Journal of Biomedical Science*, 59, 76–79. <https://doi.org/10.1080/09674845.2002.11783638>.

Odyniec, M., Stenzel, T., Ławreszuk, D., & Bancercz-Kisiel, A. (2020). Bioserotypes, Virulence Markers, and Antimicrobial Susceptibility of *Yersinia enterocolitica* Strains Isolated from Free-Living Birds. *BioMed Research International*, 2020, 1-6 <https://doi.org/10.1155/2020/8936591>

Olsen, B., Persson, K., & Broholm, K. A. (1998). PCR detection of *Chlamydia psittaci* in faecal samples from passerine birds in Sweden. *Epidemiology and Infection*, 121(2), 481–484. <https://doi.org/10.1017/S0950268898001320>

Origlia, J. A., Cadario, M. E., Frutos, M. C., Lopez, N. F., Corva, S., Unzaga, M. F., Piscopo, M. V., Cuffini, C., & Petruccelli, M. A. (2019). Detection and molecular characterization of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia abortus* in psittacine pet birds in Buenos Aires province, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*, 51(2), 130–135. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.04.003>

Origlia, J. A., Lopez, N., Cadario, M. E., & Arias, N. (2016). Detección de *Chlamydia psittaci* en aves mascotas y de producción durante marzo de 2013 a marzo de 2014. *RAZyEIE*, *10*(2), 51-52.

Osman, K. M., Ali, H. A., Eljakee, J., & Galal, H- M. (2012). Prevalence of *Chlamydia psittaci* infections in the eyes of Cattle, buffaloes, sheep and goats in contact with a human population. *Transboundary and Emerging Diseases*, *60*(3), 245-251. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2012.01337.x>

Páramo, P., & Mejía, M. A. (2004). Los parques urbanos como oportunidades para la interacción de los niños con los animales. *Revista Latinoamericana de psicología*, *36*(1), 73-84.

Partecke, J., Schwabl, I., & Gwinner, E. (2006). City: Urbanization and Its Effects on the Stress Physiology in European Blackbirds. *Ecology*, *87*(8), 1945–1952. <https://doi.org/10.2307/20069178>

Patón, D., Romero, F., Cuenca, J., & Escudero, J. C. (2012). Tolerance to noise in 91 bird species from 27 urban gardens of Iberian Peninsula. *Landscape and Urban Planning*, *104*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2011.09.002>

Peng, Z., Zou, M., Li, M., Liu, D., Guan, W., Hao, Q., Xu, J., Zhang, S., Jing, H., Li, Y., Liu, X., Yu, D., Yan, S., Wang, W., & Li, F. (2018). Prevalence, antimicrobial resistance and phylogenetic characterization of *Yersinia enterocolitica* in retail poultry meat and swine feces in parts of China. *Food Control*, *93*, 121–128. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.05.048>

Peters, K., Elands, B., & Buijs, A. (2010). Social interactions in urban parks: Stimulating social cohesion? *Urban Forestry and Urban Greening*, *9*(2), 93–100. <https://doi.org/10.1016/j.ufug.2009.11.003>

Pincetl, S., & Gearin, E. (2005). The reinvention of public green space. *Urban Geography*, 26, 365-384. <https://doi.org/10.2747/0272-3638.26.5.365>

Pisanu, B., Laroucau, K., Aaziz, R., Vorimore, F., Gros, A. Le, Chapuis, J.-L., & Clergeau, P. (2018). Chlamydia avium detection from a Ring-Necked Parakeet (*Psittacula krameri*) in France. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 27(2), 68-74. <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2018.02.03510.1111/1365-2435.1202210.1111/j.1365-2435.2012.02>

Plaza PI, Gamarra-Toledo V, Euguí JR, Lambertucci SA. (2024). Recent Changes in Patterns of Mammal Infection with Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N1) Virus Worldwide. *Emerging Infectious Diseases*, 30(3), 444-452. doi: 10.3201/eid3003.231098. PMID: 38407173; PMCID: PMC10902543.

Podschun. R., & Ullmann, U. (1998). *Klebsiella spp.* Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clinical Microbiology Reviews*, 589-603. <https://doi.org/10.1128/cmr.11.4.589>

Popiołek, M., Szczęśna-Staśkiewicz, J., Bartoszewicz, M., Okarma, H., Smalec, B., & Zalewski, A. (2011). Helminth parasites of an introduced invasive carnivore species, the raccoon (*Procyon lotor L.*), from the warta mouth national park (Poland). *Journal of Parasitology*, 97(2), 357–360. <https://doi.org/10.1645/GE-2525.1>

Postigo, J. L., Carrillo-Ortiz, J., Domènech, J., Tomàs, X., Arroyo, L., & Senar, J. C. (2021). Dietary plasticity in an invasive species and implications for management: the case of the monk parakeet in a Mediterranean city. *Animal Biodiversity and Conservation*, 185–194. <https://doi.org/10.32800/abc.2021.44.0185>

Prajna, N. V., Lalitha, P., Chen, C., Zhong, L., Lietman, T. M., Doan, T., & Seitzman, G. D. (2022). Acute Keratoconjunctivitis Resulting From Coinfection With Avian Newcastle Virus and Human Adenovirus. *Cornea*, 41(5), 630–631. <https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000002853>

*Programa de vigilancia de la Influenza Aviar en España 2024.* (2023). Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Pruett-Jones, S. (2021). *Naturalized parrots of the world: distribution, ecology, and impacts of the world's most colorful colonizers.* Princeton University Press. <https://doi.org/10.2307/j.ctv1g13jxb>

Qin, X., Huang, J., Yang, Z., Sun, X., Wang, W., Gong, E., Cao, Z., Lin, J., Qiu, Y., Wen, B., Kan, B., Xu, J., & Qin, T. (2022). Severe community-acquired pneumonia caused by *Chlamydia psittaci* genotype E/B strain circulating among geese in Lishui city, Zhejiang province, China. *Emerging Microbes and Infections*, 11(1), 2715-2723. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2140606>

Radvak, P., Kosikova, M., Kuo, Y. C., Li, X., Garner, R., Schmeisser, F., Kosic, I., Ye, Z., Weir, J. P., Yewdell, J. W., & Xie, H. (2021). Highly pathogenic avian influenza A/Guangdong/17SF003/2016 is immunogenic and induces cross-protection against antigenically divergent H7N9 viruses. *npj Vaccines*, 6(1), 30. 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41541-021-00295-7>

Reijnen, R., Foppen, R., & Veenbaas, G. (1997). Disturbance by traffic of breeding birds: evaluation of the effect and considerations in planning and managing road corridors. *Biodiversity and Conservation*, 6, 567-581. [https://doi.org/10.1142/9781860949586\\_0021](https://doi.org/10.1142/9781860949586_0021)

Sachse, K., Laroucau, K., & Vanrompay, D. (2015). Avian Chlamydiosis. *Current Clinical Microbiology Reports*, 2(1), 10–21. <https://doi.org/10.1007/s40588-014-0010-y>

Sacristán, C., Esperón, F., Herrera-León, S., Iglesias, I., Neves, E., Nogal, V., Muñoz, M. J., & de la Torre, A. (2014). Virulence genes, antibiotic resistance and integrons in *Escherichia coli* strains isolated from synanthropic birds from Spain. *Avian Pathology*, 43(2), 172–175. <https://doi.org/10.1080/03079457.2014.897683>

Sainsbury, A., Deaville, R., Lawson, B., Cooley, W., Farelly, S., Stack, M., Duff, P., McInnes, C., Gurnell, J., Russell, P., Rushton, S., Pfeiffer, D., Nettleton, P. & Lurz, P. (2008). Poxviral disease in red squirrel *Sciurus vulgaris* in the UK: Spatial and temporal trends of an emerging threat. *Ecohealth*, 5, 305-316. <https://doi.org/10.1007/s10393-008-0191-z>

Sainz-Borgo, C. (2021). Riqueza y abundancia de la avifauna de diversos parques de Madrid, España. *Saber, Universidad de Oriente, Venezuela*, 33, 252-260. <https://doi.org/10.5281/zenodo.6900754>

Schautteet, K., & Vanrompay, D. (2011). *Chlamydiaceae* infections in pig. *Veterinary Research*, 42 (1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-29>

Seifi, S., Khoshbakht, R. & Azizpour, A. (2019). Occurrence of *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Arcobacter* in pet birds of northern Iran. *Journal of Hellenic Veterinary Medical Society*, 70(4), 1771-1776. <https://doi.org/10.12681/jhvms.22248>

Senar, J. C., Conroy, M., & Montalvo, T. (2021). *Decision-making Models and Management of the Monk Parakeet*. In: Pruett-Jones (ed). *Naturalized parrots of the world: distribution, ecology, and impacts of the world's most colorful colonizers*. Princeton University Press. <https://doi.org/10.2307/j.ctv1g13jxb.11>

Silva, J., Mota, R., Vilela, S., Doretto Junior, L., Pinheiro Junior, J., & Silva, L. (2006). Newcastle disease virus infection in sparrows (*Passer domesticus*, Linnaeus, 1758) captured in poultry farms of the State of Pernambuco. *Revista Brasileira de Ciencia Avícola*, 8(2), 125-129. <https://doi.org/10.1590/s1516-635x2006000200009>

Songserm, T., Jam-on, R., Sae-Heng, N., Meemak, N., Hulse-Post, D. J., Sturm-Ramirez, K., & Webster, R. G. (2006). Domestic Ducks and H5N1 Influenza Epidemic, Thailand. *Emerging Infectious Diseases*, 12 (4), 575-581. <https://doi.org/10.3201/eid1204.051614>

Spackman, E., Senne, D. A., Myers, T. J., Bulaga, L. L., Garber, L. P., Perdue, M. L., Lohman, K., Daum, L. T., & Suarez, D. L. (2002a). Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *Journal of Clinical Microbiology*, *40*(9), 3256–3260. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.9.3256-3260.2002>

Stokes, H. S., Berg, M. L., & Bennett, A. T. D. (2021). A Review of Chlamydial Infections in Wild Birds. *Pathogens*, *10*(8), 948. <https://doi.org/10.3390/pathogens10080948>

Strohbach, M. W., Lerman, S. B., & Warren, P. S. (2013). Are small greening areas enhancing bird diversity? Insights from community-driven greening projects in Boston. *Landscape and Urban Planning*, *114*, 69–79. <https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2013.02.007>

Stuart, S., Chanson, J., Cox, N., Young, B., Rodrigues, A., Fischman, D. & Waller, R. (2004). Status and trends of amphibian declines and extinctions worldwide. *Science*, *306*, 1738-1786. <https://doi.org/10.1126/science.1103538>

Stunzner, D., Thiel, W., Potsch, F., & Sixl, W. (1980). Isolation of influenza viruses from exotic and central european birds. *Zentralblatt Fur Bakteriologie Mikrobiologie Und Hygiene - Abt. 1 Orig. A*, *247*(1), 8–17. [https://doi.org/10.1016/s0172-5599\(80\)80015-0](https://doi.org/10.1016/s0172-5599(80)80015-0)

Sutherland, M., Sarker, S., Vaz, P. K., Legione, A. R., Devlin, J. M., Macwhirter, P. L., Whiteley, P. L., & Raidal, S. R. (2019). Disease surveillance in wild Victorian cacatuids reveals co-infection with multiple agents and detection of novel avian viruses. *Veterinary Microbiology*, *235*, 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.07.012>

Swayne, D. E., & Suarez, D. L. (2000). Highly pathogenic avian influenza. *Revue scientifique of technique. Office International des Epizooties*, *19*(2), 463-482.

Thu, H. T. V., Anh, D. T. L., & Dong, L. V. (2019). *Escherichia coli* infection in ducks in the Mekong Delta: Bacterial isolation, serogroup distribution and antibiotic resistance. *Can*

*Tho University Journal of Science*, 11(1), 24-29.  
<https://doi.org/10.22144/ctu.jen.2019.003>

Tsai, H.-J., & Hsiang, P.-H. (2005). The Prevalence and Antimicrobial Susceptibilities of Salmonella and Campylobacter in Ducks in Taiwan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 67(1), 7-12. <https://doi.org/10.1292/jvms.67.7>

United Nations. (2008). World Urbanization Prospects: The 2007 Revision. *United Nations, New York*.

Van Der Waaij, D. (1983). Colonization Pattern of the Digestive Tract by Potentially Pathogenic Microorganisms: Colonization-controlling Mechanisms and Consequences for Antibiotic Treatment. *Infection*, 11(2), 90-92. <https://doi.org/10.1007/bf01645295>

Van Lint, P., De Witte, E., De Henau, H., De Muynck, A., Verstraeten, L., Van Herendael, B., & Weekx, S. (2015). Evaluation of a real-time multiplex PCR for the simultaneous detection of *Campylobacter jejuni*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*/EIEC, and *Yersinia enterocolitica* in fecal samples. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 34(3), 535–542. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2257-x>

Vanrompay, D., Andersen, A. A., Ducatelle, R., & Haesebrouck, F. (1993). Serotyping of European Isolates of *Chlamydia psittaci* from Poultry and Other Birds. *Journal Of Clinical Microbiology*, 31(1), 134-137. <https://doi.org/10.1128/jcm.31.1.134-137.1993>

Vanrompay, D., Butaye, P., Sayada, C., Ducatelle, R., & Haesebrouck, F. (1997). Characterization of avian *Chlamydia psittaci* strains using omp1 restriction mapping and serovar-specific monoclonal antibodies. *Research in Microbiology*, 148(4), 1-333. [https://doi.org/10.1016/s0923-2508\(97\)81588-4](https://doi.org/10.1016/s0923-2508(97)81588-4)

Vázquez, B., Esperón, F., Neves, E., López, J., Ballesteros, C., & Muñoz, M. J. (2010). Screening for several potential pathogens in feral pigeons (*Columba livia*) in Madrid. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52(1), 1-6. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-52-45>

Vidal, R., Vidal, M., Lagos, R., Levine, M., & Prado, V. (2004). Multiplex PCR for Diagnosis of Enteric Infections Associated with *Diarrheagenic Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(4), 1787–1789. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.4.1787-1789.2004>

Vijayan, V. (1981). *Role of parrots in the epizootiology of newcastle disease*. College of Veterinary and Animal Sciences.

Vlahović, K., Matica, B., Bata, I., Pavlak, M., Pavičić, Ž., Popović, M., Nejedli, S., & Dovč, A. (2004). *Campylobacter, salmonella* and *chlamydia* in free-living birds of Croatia. *European Journal of Wildlife Research*, 50(3), 127–132. <https://doi.org/10.1007/s10344-004-0052-1>

Wang M, Wei Y, Pu J, Bing G, Sun Y, Sun H, Wei F, Liu J. (2018), Cross- immunity of a H9N2 live attenuated influenza vaccine against H5N2 highly pathogenic avian influenza virus in chickens. *Veterinary Microbiology*, 220, 57-66. doi: 10.1016/j.vetmic.2018.05.005

Wang, Y., Tang, C., Yu, X., Xia, M., & Yue, H. (2010). Distribution of serotypes and virulence-associated genes in pathogenic *Escherichia coli* isolated from ducks. *Avian Pathology*, 39(4), 297–302. <https://doi.org/10.1080/03079457.2010.495742>

Williams, R. A. J., Segovia-Hinostroza, K., Ghersi, B. M., Gonzaga, V., Townsend Peterson, A., & Montgomery, J. M. (2012). Avian influenza infections in nonmigrant land birds in Andean Peru. *Journal of Wildlife Diseases*, 48(4), 910–917. <https://doi.org/10.7589/2011-02-052>

Wise, M. G., Suarez, D. L., Seal, B. S., Pedersen, J. C., Senne, D. A., King, D. J., Kapczynski, D. R., & Spackman, E. (2004). Development of a Real-Time Reverse-Transcription PCR for Detection of Newcastle Disease Virus RNA in Clinical Samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(1), 329–338. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.1.329-338.2004>

Yusoff, K., & Wen Siang Tan. (2001). Newcastle disease virus: Macromolecules and opportunities. *Avian Pathology*, 30(5), 439–455.  
<https://doi.org/10.1080/03079450120078626>

Zbikowski A, Szeleszczuk P, Karpinska E, Rzewuska M, Malicka, E, Binek M. (2006) Epidemic deaths of Mallard ducks after *Aeromonas hydrophila* infection. *Medycyna Weterynaryjna*, 62, 720–722.

Zhang, S., Chen, S., Abbas, M., Wang, M., Jia, R. Chen, S., & Cheng, A. (2021). High incidence of multi-drug resistance and heterogeneity of mobile genetic elements in *Escherichia coli* isolates from diseased ducks in Sichuan province of China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 222, 112-475.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112475>