

II Workshop Ibérico de Investigación en **Tuberculosis Animal**

“¡Jaque ma**TB!**”



Córdoba
16-18 noviembre 2022



Aviso Legal: los contenidos de esta publicación podrán ser reutilizados, citando la fuente y la fecha, en su caso, de la última actualización.



**MINISTERIO
DE AGRICULTURA, PESCA
Y ALIMENTACIÓN**

Edita:

© Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Secretaría General Técnica

Centro de Publicaciones

Diseño y maquetación:

Leonor Muñoz Fernández

Grupo de investigación en Sanidad animal y Zoonosis (GISAZ)

Universidad de Córdoba

Distribución y venta:

Paseo de la Infanta Isabel, 1

28014 Madrid

Teléfono: 91 347 55 41

Fax: 91 347 57 22

Tienda virtual: www.mapa.gob.es

centropublicaciones@mapa.es

Impresión y encuadernación:

Talleres del Centro de Publicaciones del MAPA

NIPO en línea: 003230060

Catálogo de Publicaciones de la Administración General del Estado:

<https://cpage.mpr.gob.es/>

Las opiniones expresadas en esta obra corresponden exclusivamente a sus autores y no reflejan necesariamente los puntos de vista del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación

II Workshop Ibérico de Investigación en Tuberculosis Animal

LIBRO DE RESÚMENES



COMITÉ ORGANIZADOR

M^a Ángeles Risalde Moya (Presidenta)

Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas y Toxicología. Universidad de Córdoba.

Remigio Martínez Pérez (Secretario)

Departamento de Sanidad Animal. Universidad de Extremadura – Universidad de Córdoba.

Ignacio García Bocanegra

Departamento de Sanidad Animal. Universidad de Córdoba.

David Cano Terriza

Departamento de Sanidad Animal. Universidad de Córdoba.

Javier Caballero Gómez

Departamento de Sanidad Animal. Universidad de Córdoba.

Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC).

Jorge Paniagua Risueño

Departamento de Sanidad Animal. Universidad de Córdoba.

José Luis Saéz Llorente

Jefe de Área de Programas Sanitarios y Zoonosis. Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad. MAPA.

Nuno Santos

Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos.

Manuel Fernández Morente

Jefe del Servicio de Sanidad Animal de la Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural de la Junta de Andalucía.

COMITÉ CIENTÍFICO

Antonio Arenas Casas

Departamento de Sanidad Animal. Universidad de Córdoba.

João Queirós

Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos.

José Manuel Benítez Medina

Departamento de Sanidad Animal. Universidad de Extremadura.

Moisés González Juan

Departamento de Sanidad Animal. Universidad de Murcia - Universidad de Córdoba.

Saúl Jiménez Ruiz

Departamento de Sanidad Animal. Universidad de Córdoba.

Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos. Universidad de Castilla-La Mancha.

PROGRAMA

Miércoles, 16 de noviembre

16:00 - 17:30 h. Entrega de documentación. Lugar: Rectorado de la Universidad de Córdoba.

19:00 h. Espectáculo Córdoba Ecuestre en las Caballerizas Reales.

20:30 h. Cóctel de bienvenida y aperitivo. LUGAR: Caballerizas Reales.

Jueves, 17 de noviembre

8:00 - 8:30 h. Entrega de documentación

8:30 - 9:00 h. Bienvenida, inauguración oficial y presentación del programa del Workshop.

- Excmo Sr. D. José Carlos Gómez, Consejero de Universidad, Investigación e Innovación de la Junta de Andalucía.
- Sr. D. Valentín Almansa, Director General de Sanidad de la Producción Agraria, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Gobierno de España.
- Sr. D. Manuel Gómez, Director General de la Producción Agrícola y Ganadera, Consejería de Agricultura, Pesca, Agua y Desarrollo Rural de la Junta de Andalucía.
- Sr. D. Antonio Arenas Casas, Vicerrector Magnífico de la Universidad de Córdoba.
- Dra. M^a Ángeles Risalde, Presidenta del II Workshop Ibérico de Investigación en Tuberculosis Animal.

9:00 - 10:00 h. Ponencia invitada: "Progreso y actuaciones futuras en los programas de erradicación de la tuberculosis animal en España y Portugal".

Sr. D. José Luis Sáez, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Gobierno de España.

Dra. Yolanda Vaz, Area de Agricultura e Alimentação - Direção-Geral de Alimentação e Veterinária, Governo de Portugal.

10:00 - 11:00 h. Nuevos avances científicos de los Grupos de investigación (I).

10.00 - 10.15 h - Grupo IUSA-ULPG. Dra. Marisa Ana Andrada.

10.15 - 10.30 h - Grupo UAB. Dr. Alberto Oscar Allepuz.

10.30 - 10.45 h. Grupo CIBIO. Dr. Nuno Santos.

10.45 - 11.00 h. Grupo ISCIII. Dra. Inmaculada Moreno.

11:00 - 11:30 h. Pausa Café.

11:30 - 12:30 h. Ponencias invitadas:

- "Una revisión sobre la priorización de enfermedades infecciosas en el contexto Una única salud: ¿qué tal la tuberculosis?". Dr. Joaquín Vicente. Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos - Universidad de Castilla-La Mancha, España.
- "Lucha frente a la tuberculosis desde un punto de vista sociológico". Dra. Giovanna Ciaravino. Universidad Autónoma de Barcelona, España

12:30 - 14:00 h. Nuevos avances científicos de los Grupos de investigación (II).

12.30 - 12.45 h - Grupo GISAZ-UCO. Dra. Maria Ángeles Riscalde.

12.45 - 13.00 h - Grupo NEIKER. Dr. Joseba Garrido.

13.00 - 13.15 h. Grupo IRTA-CReSA. Dr. Bernat Pérez.

13.15 - 13.30 h. Grupo PATIN-UEx. Dr. José Manuel Benítez.

14:00 - 15:30 h. Comida.

15:30 - 16:00 h. Nuevos avances científicos de los Grupos de investigación (III).

15.30 - 15.45 h - Grupo VISAVET-UCM. Dra. Beatríz Romero.

15.45 - 16.00 h - Grupo Lab. Ref TB-EU-RL. Dra. Lucía de Juan

16:00 - 16:30 h. Pausa Café.

16:30 - 17:30 h. Ponencias invitadas:

- "Diagnóstico de tuberculosis: dilema entre tradición y vanguardia". Dr. Javier Bezos, Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria - Universidad Complutense de Madrid, España.
- "Investigación aplicada al diagnóstico ambiental de la tuberculosis y nuevos avances en la vigilancia genómica". Dra. Mónica Sofía Vieira. Universidade de Lisboa, Portugal.

20:30 h. Cena de confraternización. LUGAR: Rectorado de la Universidad de Córdoba.

Viernes, 18 de noviembre

9:00 - 10:00 h. Nuevos avances científicos de los Grupos de investigación (IV).

9.00 - 9.15 h. Grupo IREC-UCLM. Dr. Christian Gortázar.

9.15 - 9.30 h. Grupo UCO-PIG. Dr. Jaime Gómez.

9.30 - 9.45 h. Grupo ULE- Dra. Ana Balseiro.

9.45 - 10.00 h. Grupo CE3C. Dra. Mónica Sofía Vieira.

10:00 - 11:30 h. Mesa redonda I: Gestión de la TB desde el punto de vista de los servicios veterinarios.

- Sr. D. Manuel Fernández. Representante de SVO Región Alta prevalencia.
- Dra. Ana Sofia Campos. Representante de SVO Región Baja prevalencia.
- Sr. D. Alberto Díez. Representante de ADS.
- Sr. D. Miguel Ángel Perea. Representante de Colegios Oficiales Veterinarios.

Moderador: Sr. D. José Luis Sáez.

11:30 - 12:00 h. Pausa Café.

12:00 - 13:30 h. Mesa redonda II: Control de la TB en la interfaz.

Sr. D. Joaquín Antonio Pino. Representante de los Ganaderos.

Sr. D. José Antonio López. Representante de las Federaciones de Caza.

Sr. D. Félix Gómez-Guillamón. Representante de los Servicio de Gestión del Medio Natural.

Moderador: Dr. Christian Gortázar.

13:30 - 14:00 h. Conclusiones de la reunión y Cierre del Congreso.

14:00 - 16:00 h. Comida.

17:00 h. Visita guiada por Córdoba. LUGAR: Puerta de Almodóvar.

ÍNDICE

1. PRÓLOGO

2. PONENCIAS INVITADAS

PROGRESO Y ACTUACIONES FUTURAS EN LOS PROGRAMAS NACIONALES DE ERRADICACIÓN DE LA INFECCIÓN POR EL COMPLEJO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EN PORTUGAL Y ESPAÑA.... 13

JOSÉ LUIS SÁEZ LLORENTE, YOLANDA VAZ

DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS BOVINA. DILEMA ENTRE TRADICIÓN Y VANGUARDIA 26

JAVIER BEZOS, JULIO ÁLVAREZ, BEATRIZ ROMERO, LUCAS DOMÍNGUEZ, LUCÍA DE JUAN

INVESTIGAÇÃO APLICADA AO DIAGNÓSTICO AMBIENTAL DA TUBERCULOSE ANIMAL E NOVOS AVANÇOS EM VIGILÂNCIA GENÓMICA..... 33

ANDRÉ C. PEREIRA, DANIELA PINTO, MÓNICA V. CUNHA

LUCHA FRENTE A LA TUBERCULOSIS DESDE UN PUNTO DE VISTA SOCIOLÓGICO..... 37

GIOVANNA CIARAVINO, JOSEP ESPLUGA, JORDI CASAL, ALBERTO ALLEPUZ

UNA REVISIÓN SOBRE LA PRIORIZACIÓN DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS EN EL CONTEXTO UNA UNICA SALUD: ¿QUÉ TAL LA TUBERCULOSIS? 46

JOAQUÍN VICENTE BAÑOS

3. GRUPOS DE INVESTIGACIÓN

GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN SANIDAD ANIMAL Y ZOOZINOSIS (GISAZ) 53

GRUPO UCO-PIG (PATHOLOGY AND IMMUNOLOGY GROUP)..... 61

UNIVERSIDAD DE LEÓN 66

IRTA-CRESA 72

NEIKER – INSTITUTO VASCO DE INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO AGRARIO 78

GRUPO DE INVESTIGACIÓN DE SANIDAD Y BIOTECNOLOGÍA (SABIO) DEL IREC 85

IUSA-ONEHEALTH 3..... 91

CENTRO DE INVESTIGAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E RECURSOS GENÉTICOS (CIBIO) 96

LABORATORIO DE REFERENCIA EUROPEO (EU-RL) DE TUBERCULOSIS BOVINA..... 101

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA (UAB) 105

CENTRO DE VIGILANCIA SANITARIA VETERINARIA (VISAVET) 113

PATOLOGÍA INFECCIOSA VETERINARIA. UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA (PATIN-UEX) 120

UNIDAD DE INMUNOLOGÍA MICROBIANA (ISCIII)..... 126

LANDSCAPE EPIDEMIOLOGY AND WILDLIFE DISEASES, CENTRE FOR ECOLOGY, EVOLUTION AND ENVIRONMENTAL CHANGES (CE3C) 131

4. MESA REDONDA I

GESTIÓN DE LA TB DESDE EL PUNTO DE VISTA DE LOS SERVICIOS VETERINARIOS..... 140

ALBERTO A. DÍEZ GUERRIER

GESTÃO DA TUBERCULOSE BOVINA DO PONTO DE VISTA DOS SERVIÇOS VETERINÁRIOS
REGIONAIS EM PORTUGAL..... 142

ANA SOFIA CAMPOS, MARIA JOSÉ CALIXTO, CRISTINA MIRA FERREIRA DE SOUSA, MARIA JOSÉ VALLEJO DE
CARVALHO, SÍLVIA MARQUES, JOANA GODINHO

APLICACIÓN DEL PROGRAMA NACIONAL DE ERRADICACIÓN DE TUBERCULOSIS EN
COMUNIDADES AUTÓNOMAS DE ALTA PREVALENCIA..... 146

ÁNGEL CAMACHO CARRASCO

4. MESA REDONDA II

PROGRAMA DE VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE LA FAUNA SILVESTRE EN ANDALUCÍA.
TUBERCULOSIS..... 152

FÉLIX GÓMEZ-GUILLAMÓN MANRIQUE¹, LEONOR N. CAMACHO SILLERO¹, VENTURA TALAVERA NAVARRETE

GESTIÓN CINEGÉTICA RESPONSABLE PARA EL CONTROL DE LA TB EN COTOS DE CAZA 156

JOSÉ ANTONIO LÓPEZ GARCÍA

CONTROL DE LA TUBERCULOSIS EN LA INTERFAZ 159

JOAQUÍN ANTONIO PINO

6. CONCLUSIONES 160

7. LISTA DE ASISTENTES 162

PRÓLOGO

La tuberculosis animal es una enfermedad incluida en la categoría B en el Reglamento de la Unión Europea (EU) 2016/429, es decir, es una enfermedad que debe controlarse en bovinos en todos los Estados miembros con el objetivo de erradicarla en toda la UE. Esta enfermedad tiene una gran relevancia en Sanidad animal ocasionando importantes pérdidas económicas en los rebaños afectados. Por ello, la tuberculosis animal es objeto de erradicación en todos los países desarrollados y está sometida a un Programa de control y erradicación en Europa. La lucha frente a la tuberculosis animal ha supuesto un descenso significativo de la prevalencia en la Península ibérica, dando lugar a la calificación de regiones libres de enfermedad, aunque con un cierto estancamiento de la prevalencia en otras regiones de mayor riesgo.

En el año 2015, la Dra. Ana Balseiro y el Dr. Christian Gortázar proponen reunir a los diferentes grupos españoles de investigación en tuberculosis y a los principales representantes de las administraciones, el sector ganadero, el subsector cinegético y las empresas implicadas, con el objetivo principal de identificar sus sinergias y potenciar sus interacciones en la lucha frente a esta enfermedad. Debido al éxito de estas Jornadas, se decide volver a organizarlas cada cuatro años. En 2019, tiene lugar el I Workshop Ibérico de Investigación en Tuberculosis Animal organizado por el Grupo de investigación de Patología Infecciosa Veterinaria de la Universidad de Extremadura (PATIN-UEx) y el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), donde se potencia la colaboración científica e institucional con Portugal frente a la tuberculosis animal. Durante estos años, las colaboraciones entre los grupos de investigación y los sectores interesados se han estrechado, hecho que se refleja en la participación conjunta en distintos estudios y proyectos de investigación nacionales e internacionales, la firma de convenios y contratos con las administraciones, o la creación de grupos operativos autonómicos y supraautonómicos para la aplicación de medidas innovadoras en el diagnóstico y el control de la tuberculosis animal.

Durante el Workshop celebrado en Cáceres, D. José Luis Sáez, como jefe de Área de Programas Sanitarios y Zoonosis del MAPA, nos propone al Grupo de investigación de Sanidad Animal y Zoonosis (GISAZ) de la Universidad de Córdoba (UCO) organizar, de la mano del MAPA, la siguiente edición de éste cada vez más conocido Workshop en 2022. Desde el GISAZ aceptamos la propuesta con mucha ilusión, la cual se hizo más patente tras la pandemia del Covid-19, desde la que se valora mucho más reunirse en persona con compañeros/as y amigos/as. Así, para la celebración del II Workshop Ibérico de Investigación en Tuberculosis Animal hemos elegido el Rectorado de la UCO, un edificio de gran significación arquitectónica e histórica, ya que albergaba nuestra antigua Facultad de Veterinaria y que este año celebra su 175 aniversario. Como miembros de dicha institución, nos enorgullece la designación de Córdoba y de este lugar tan emblemático como sede de esta reunión de especial interés para la Sanidad animal.

En el 2022, la lucha frente a la tuberculosis animal sigue siendo un reto al que se enfrenta diariamente el sector ganadero, los servicios veterinarios, las administraciones, la gestión cinegética, así como la comunidad científica y los laboratorios públicos y privados que centran sus estudios en esta enfermedad. La historia nos ha enseñado que esta lucha no debe entenderse de forma aislada, sino de una estrategia coordinada y colaborativa entre “todas las piezas del ajedrez” para establecer y aplicar las múltiples medidas de control, como único camino para revertir la dinámica de la enfermedad en las zonas de riesgo y conseguir darle ese tan deseado “jaque mate” en 2030. Por ello, es absolutamente imprescindible el desarrollo de reuniones científico-técnicas dedicadas a la tuberculosis

animal como el II Workshop Ibérico de Investigación en Tuberculosis Animal celebrado en Córdoba, donde los distintos sectores implicados interaccionen para discutir los nuevos avances en investigación, legislación, gestión, diagnóstico y otras medidas de control para dar respuesta a nuevas situaciones que redunden en beneficio para la Sanidad Animal y la Salud Pública.

Desde el Comité Organizador del II Workshop Ibérico de Investigación en Tuberculosis Animal queremos dar las gracias a todos los asistentes, ponentes, grupos de investigación, administraciones, empresas, patrocinadores y colaboradores por hacer posible la celebración de este evento, así como por todas vuestras aportaciones tan necesarias para establecer y aplicar las medidas de control capaces de revertir la dinámica de esta enfermedad en las zonas de alto riesgo y mantener su control en zonas de menor riesgo de presentación.

PONENCIAS INVITADAS



Progreso y actuaciones futuras en los Programas Nacionales de Erradicación de la infección por el complejo *Mycobacterium tuberculosis* en Portugal y España

José Luis Sáez Llorente¹, Yolanda Vaz²

¹ Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad. Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

² Direção de Serviços de Proteção Animal. Direção Geral de Alimentação e Veterinária. Ministério da Agricultura e Alimentação.

jsaezll@mapa.es / yolanda.vaz@dgav.pt

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por micobacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) que afecta al hombre y gran número de especies animales.

A tuberculose é uma doença infecciosa causada por micobactérias do complexo Mycobacterium tuberculosis (CMTB) que afetam os seres humanos e um grande número de espécies animais.

La importancia de esta enfermedad radica en varios factores, ya que además de su aspecto zoonótico no hay que olvidar que la tuberculosis produce importantes pérdidas directas en los rebaños afectados, algo poco apreciable en fases avanzadas de la erradicación por los pocos animales que presentan sintomatología o decomisos en matadero, algo que depende en gran medida de la eficacia de las medidas aplicadas en los distintos programas de erradicación a la hora de detectar animales infectados y retirarlos de los rebaños lo antes posible. Un establecimiento, comarca, provincia, región o incluso país sin calificación sanitaria sufre serias limitaciones a la comercialización de sus animales y productos, siendo éste un factor que cada vez cobra más relevancia.

A importância desta doença reside em vários fatores, uma vez que, para além do seu aspeto zoonótico, não se deve esquecer que a tuberculose causa perdas diretas significativas nos efetivos afetados, algo que não é muito perceptível em fases avançadas de erradicação devido aos poucos animais que apresentam sinais ou rejeições ao abate, algo que depende em grande parte da eficácia das medidas aplicadas nos vários programas de erradicação para detetar os animais infetados e retirá-los dos efetivos o mais rapidamente possível. Um estabelecimento, concelho, distrito, região ou mesmo país sem estatuto sanitário sofre sérias limitações à comercialização dos seus animais e produtos, e este é um fator que se está a tornar cada vez mais importante.

La infección por el CMTB, o tuberculosis bovina, es una enfermedad listada en aplicación del Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 9 de marzo de 2016,

relativo a las enfermedades transmisibles de los animales y por el que se modifican o derogan algunos actos en materia de sanidad animal («Legislación sobre sanidad animal» o AHL). El Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882, categorizó la enfermedad como B, es decir, como una enfermedad de la lista que debe controlarse en todos los Estados miembros con el objetivo de erradicarla en toda la Unión, como señala el artículo 9, apartado 1, letra b), del Reglamento (UE) 2016/429, en bovinos (*Bos spp.*, *Bison spp.* y *Bubalus spp.*).

*A infeção pelo CMTB, ou tuberculose bovina, é uma doença incluída na lista de doenças em aplicação do Regulamento (UE) 2016/429 do Parlamento Europeu e do Conselho de 9 de março de 2016 sobre doenças animais transmissíveis e que altera ou revoga certos atos de saúde animal ("Lei da Saúde Animal" ou LSA). O Regulamento Delegado (UE) 2018/1882, classificou a doença como B, ou seja, como uma doença da lista a controlar em todos os Estados-Membros, com o objetivo de a erradicar em toda a União, tal como referido no n.º 1, alínea b), do artigo 9, do Regulamento (UE) 2016/429, nos bovídeos (*Bos spp.*, *Bison spp.* e *Bubalus spp.*).*

Los Estados Miembros, en aplicación del Reglamento Delegado (UE) 2020/689 de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 en lo referente a las normas de vigilancia, los programas de erradicación y el estatus de libre de enfermedad con respecto a determinadas enfermedades de la lista y enfermedades emergentes, han presentado a más tardar el 31 de mayo de 2021 los programas de erradicación obligatoria para esta enfermedad de categoría B, para su aprobación por la Comisión Europea, que en el caso de España abarca el periodo 2022-2030 y en el de Portugal el periodo 2022-2027.

Os Estados-Membros, em aplicação do Regulamento Delegado (UE) 2020/689 da Comissão, de 17 de Dezembro de 2019, que completa o Regulamento (UE) 2016/429 no que respeita às regras de vigilância, programas de erradicação e estatuto de indemnidade relativamente a determinadas doenças enumeradas e emergentes, apresentaram até 31 de maio de 2021 os programas de erradicação obrigatória desta doença da categoria B, para aprovação pela Comissão Europeia, abrangendo o período 2022-2030 para Espanha e 2022-2027 para Portugal.

Dichos programas fueron aprobados mediante el Reglamento de Ejecución (UE) 2022/214 de la Comisión, de 17 de febrero de 2022, por el que se modifican determinados anexos del Reglamento de Ejecución (UE) 2021/620 en lo que se refiere a la aprobación o la retirada del estatus de libre de enfermedad de determinados Estados miembros, zonas o compartimentos de estos, en lo que respecta a determinadas enfermedades de la lista y a la aprobación de los programas de erradicación de determinadas enfermedades de la lista. En este Reglamento, los EEMM o zonas de éstos o bien tienen reconocido el estatuto de libre de la enfermedad, o bien tienen un programa de erradicación de la enfermedad.

Esses programas foram aprovados pelo Regulamento de Execução (UE) 2022/214 da Comissão, de 17 de fevereiro de 2022, que altera certos anexos do Regulamento de Execução (UE) 2021/620 no que diz respeito à aprovação ou retirada do estatuto de indemnidade de certos Estados-Membros, zonas ou compartimentos dos mesmos, no que diz respeito a certas doenças da lista e à aprovação de programas de erradicação de certas doenças da lista. No presente regulamento, os Estados-membros ou suas zonas têm um estatuto reconhecido de indemnidade de doenças ou têm um programa de erradicação de doenças.

En el caso de España, la situación es la siguiente:

ANEXO II, parte I - regiones libres del CMTB: Asturias, Canarias, Galicia y País Vasco.

ANEXO II, parte II - regiones que tienen aprobado un programa de erradicación de la infección por el CMTB: las nombra específicamente y son el resto de las comunidades autónomas.

Las Comunidades Autónomas de Baleares, Cataluña y Murcia pasarán a la parte I del Anexo II a principios de 2023.

Para Espanha, a situação é a seguinte:

ANEXO II, parte I - Regiões livres de CMTB: Astúrias, Ilhas Canárias, Galiza e País Basco.

ANEXO II, parte II - Regiões com um programa de erradicação CMTB aprovado: estas são especificamente designadas e são as restantes Comunidades Autónomas.

As Comunidades Autónomas de Baleares, Catalunha e Múrcia passarão para o Anexo II no início de 2023.

En el caso de Portugal, la situación es la siguiente:

ANEXO II, parte I - regiones libres de CMTB: Região Algarve: todos los distritos Región Autónoma dos Açores excepto Isla de São Miguel.

ANEXO II, parte II - regiones que tienen aprobado un programa de erradicación de la infección por el CMTB: Región Autónoma dos Açores: Isla de São Miguel; Região Autónoma da Madeira; Distritos Aveiro, Beja, Braga, Bragança, Castelo Branco, Coimbra, Évora, Guarda, Leiria, Lisboa, Portalegre, Porto, Santarém, Setúbal, Viana do Castelo, Vila Real, Viseu.

Para Portugal, a situação é a seguinte:

ANEXO II, Parte I - Regiões indemnes de CMTB: Região Algarve: todos los distritos Região Autónoma dos Açores exceto Ilha de São Miguel.

ANEXO II, parte II – Regiões com um plano aprovado de erradicação da infeção pelo CMTB: Região Autónoma dos Açores: Ilha de São Miguel; Região Autónoma da Madeira; Distritos Aveiro, Beja, Braga, Bragança, Castelo Branco, Coimbra, Évora, Guarda, Leiria, Lisboa, Portalegre, Porto, Santarém, Setúbal, Viana do Castelo, Vila Real, Viseu.

Los programas de erradicación, control y vigilancia de las enfermedades animales y zoonosis ("programas veterinarios"), entre ellos los de la tuberculosis bovina, han sido cofinanciados por la Unión Europea durante años y han contribuido inequívocamente a la mejora de la salud animal y humana. En el año 2018 se inició por parte de la Comisión Europea una revisión de los fondos asignados para cada capítulo y enfermedad, estableciendo prioridades por grupos de enfermedades. En el caso de los programas de erradicación de la tuberculosis bovina, desde ese año se han aplicado porcentajes decrecientes en la ayuda financiera de la Unión Europea hasta su total eliminación, inicialmente prevista para 2024 pero posiblemente aplicable ya desde 2023, ya que el instrumento financiero que apoya estas acciones, el Programa de Mercado Único (SMP) 2021-2027, ha entrado en una fase de insuficiencia de fondos.

Os programas de erradicação, controlo e vigilância de doenças animais e zoonoses ("programas veterinários"), incluindo os relativos à tuberculose bovina, são cofinanciados pela União Europeia há anos e têm contribuído inequivocamente para a melhoria da saúde animal e humana. Em 2018, a Comissão Europeia iniciou uma revisão dos fundos atribuídos para cada grupo e doença, estabelecendo prioridade por grupo de doenças. No caso dos programas de erradicação da tuberculose bovina, foram aplicadas percentagens decrescentes de apoio financeiro da União Europeia desde esse ano até à sua eliminação total, inicialmente prevista para 2024, mas possivelmente aplicável já em 2023, uma vez que o instrumento financeiro de apoio a estas ações, o Programa do Mercado Único (SMP) 2021-2027, entrou numa fase de insuficiência de fundos.

La dotación financiera anual se fijó para las medidas de emergencia en 19 M € y para los programas veterinarios y fitosanitarios en 127 M €. La aparición continua y sin precedentes

de enfermedades en toda la Unión Europea (principalmente Influenza Aviar y Peste Porcina Africana) ha supuesto una carga inesperada para las capacidades de respuesta financiera de las medidas de emergencia de los Estados miembros, lo que hace prever la cofinanciación de unos 450 M € desde principios de 2021 hasta el verano de 2022, superando con creces el presupuesto disponible de la UE para medidas de emergencia. Con posterioridad se han seguido produciendo focos de dichas enfermedades y han surgido otras nuevas, como la viruela ovina y caprina en España.

O envelope financeiro anual foi fixado para medidas de emergência em 19 milhões de euros e para programas veterinários e fitossanitários em 127 milhões de euros. Os surtos de doença contínuos e sem precedentes em toda a União Europeia (principalmente a gripe aviária e a peste suína africana) colocaram um fardo inesperado nas capacidades de resposta financeira das medidas de emergência dos Estados-Membros, levando a um cofinanciamento previsto de cerca de 450 milhões de euros desde o início de 2021 até ao Verão de 2022, excedendo largamente o orçamento disponível da UE para medidas de emergência. Posteriormente, os surtos da doença continuaram e surgiram novas doenças, como a varíola ovina e caprina em Espanha.

Para garantizar la disponibilidad de los créditos dentro del marco financiero plurianual 2021-2027, la Comisión ha propuesto reducir el porcentaje de co-financiación de las medidas de emergencia y de los programas veterinarios y fitosanitarios nacionales y cesar la cofinanciación de los programas de tuberculosis bovina, prevista para 2024, ya desde 2023.

Para assegurar a disponibilidade de dotações no âmbito do quadro financeiro plurianual 2021-2027, a Comissão propôs a redução da taxa de cofinanciamento para medidas de emergência e programas veterinários e fitossanitários nacionais e a suspensão do cofinanciamento de programas de tuberculose bovina, previsto para 2024, já a partir de 2023.

El Reglamento Delegado (UE) 2020/689 constituye la nueva base legal para dichos programas veterinarios e introduce novedades y nuevas posibilidades en cuanto a la vigilancia y actuaciones en diversas especies animales y en el uso de las herramientas diagnósticas en los programas de erradicación de la tuberculosis bovina. El análisis de estas nuevas posibilidades, para ser aplicadas en los programas nacionales, precisan contar con el necesario asesoramiento científico y técnico y que además proporcionen ventajas para los ganaderos a la hora de prevenir o gestionar la entrada de la enfermedad en sus establecimientos, lo que facilitará su aceptación.

O Regulamento Delegado (UE) 2020/689 constitui a nova base jurídica para estes programas veterinários e introduz novos desenvolvimentos e novas possibilidades em termos de vigilância e ações em várias espécies animais e na utilização de instrumentos de diagnóstico em programas de erradicação da tuberculose bovina. A análise destas novas possibilidades, a fim de serem aplicadas nos programas nacionais, precisa de ter o aconselhamento científico e técnico necessário e também proporcionar vantagens aos agricultores na prevenção ou gestão da entrada da doença nos seus estabelecimentos, o que facilitará a sua aceitação.

En el Workshop anterior revisamos una serie de puntos críticos que, a nuestro juicio, condicionaban el progreso de los programas de erradicación de la enfermedad, tales como la infección residual, la interacción con la fauna silvestre, los conflictos entre los sectores y la administración o los falsos dogmas. En éste proponemos centrar el intercambio de impresiones en las obligaciones y posibilidades que nos ofrece la AHL en cuestiones como la vigilancia de la enfermedad, la contención de la enfermedad en el establecimiento infectado y la prevención de la infección o la re-infección de los rebaños, lo que incluye a las especies cinegéticas que actúan como reservorio de la enfermedad para el ganado, y para

las cuales es imprescindible contar con las mejores referencias científicas. En este sentido, el artículo 32 del Reglamento (UE) 2016/429 establece que los programas de erradicación constarán, como mínimo, de las medidas siguientes: las medidas de control de enfermedades para la erradicación del agente patógeno de los establecimientos, compartimentos y zonas en los que se manifieste una enfermedad y para impedir que se vuelvan a infectar; la vigilancia ejercida de conformidad con las normas establecidas en los artículos 26 a 30 para demostrar la eficacia de las medidas de control de enfermedades contempladas o la ausencia de la enfermedad de la lista; y las medidas de control de enfermedades que deben adoptarse si los resultados de la vigilancia son positivos.

No Workshop anterior revimos uma série de pontos críticos que, na nossa opinião, condicionaram o progresso dos programas de erradicação da doença, tais como infeção residual, interação com animais selvagem, conflitos entre os sectores e a administração ou falsos dogmas. Neste propomos concentrar a troca de opiniões sobre as obrigações e possibilidades oferecidas pela LSA em questões como a vigilância da doença, a contenção da doença no estabelecimento infetado e a prevenção da infeção ou reinfeção das populações, incluindo espécies de caça que atuam como reservatório da doença para o gado, e para as quais é essencial ter as melhores referências científicas. A este respeito, o artigo 32 do Regulamento (UE) 2016/429 prevê que os programas de erradicação devem incluir pelo menos as seguintes medidas: medidas de controlo de doença para a erradicação do agente patogénico nos estabelecimentos, compartimentos e zonas onde uma doença ocorre e para evitar a reinfeção; vigilância efetuada de acordo com as regras estabelecidas nos artigos 26º a 30º para demonstrar a eficácia das medidas de controlo de doenças previstas ou a ausência da doença da lista; e medidas de controlo de doenças a serem tomadas se os resultados da vigilância forem positivos.

En la actualidad, los requisitos respecto a la vigilancia y, en concreto, a las pruebas de diagnóstico, se encuentran en distintas partes del Reglamento Delegado (UE) 2020/689. En su artículo 6 establece que la autoridad competente se asegurará de que la recogida de muestras, las técnicas, la validación y la interpretación de los métodos de diagnóstico con fines de vigilancia se ajusten a la legislación específica adoptada con arreglo al Reglamento (UE) 2016/429 y a los datos y la orientación pertinentes disponibles en los sitios web de los laboratorios de referencia de la Unión Europea y de la Comisión (EURL).

Atualmente, os requisitos de vigilância, e em particular de testes de diagnóstico, encontram-se em diferentes partes do Regulamento Delegado (UE) 2020/689. O artigo 6º estabelece que a autoridade competente deve assegurar que a recolha de amostras, técnicas, validação e interpretação de métodos de diagnóstico para fins de vigilância estejam em conformidade com a legislação específica adotada nos termos do Regulamento (UE) 2016/429 e com os dados e orientações relevantes disponíveis nos sítios web dos Laboratórios de Referência da União Europeia e da Comissão (EURL).

Cuando las pruebas no estén abarcadas por la legislación o los datos y la orientación de los EURL, éstas se realizarán de conformidad con la recogida de muestras, las técnicas, la validación y la interpretación de los métodos de diagnóstico establecidos en el Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OMSA). Cuando no estén abarcadas por dicho Manual, se ajustarán a los métodos estipulados en el artículo 34, apartado 2, letra b) del Reglamento (UE) 2017/625, relativo a los controles y otras actividades oficiales, que son métodos desarrollados o recomendados por los laboratorios de referencia nacionales y validados conforme a protocolos científicos aceptados a escala internacional.

Quando os testes não estiverem abrangidos pela legislação ou pelos dados e orientações da EURL, serão realizados em conformidade com a recolha de amostras, técnicas, validação e

interpretação dos métodos de diagnóstico estabelecidos no Manual de Testes de Diagnóstico e Vacinas para Animais Terrestres da Organização Mundial da Saúde Animal (OMSA). Quando não abrangidos por esse Manual, devem cumprir os métodos estabelecidos no artigo 34(2)(b) do Regulamento (UE) 2017/625 relativo aos controlos oficiais e outras atividades oficiais, que são métodos desenvolvidos ou recomendados por laboratórios nacionais de referência e validados de acordo com protocolos científicos internacionalmente aceites.

Los métodos de diagnóstico para la concesión y mantenimiento del estatus de libre de enfermedad se establecen en el anexo III, sección 2 del Reglamento Delegado (UE) 2020/689, para la infección por el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mycobacterium bovis*, *M. caprae* y *M. tuberculosis*): la IDTB simple y de comparación y la prueba del interferón gamma. Los protocolos para dichas pruebas están publicados en la Web del EURL.

Os métodos de diagnóstico para a concessão e manutenção do estatuto de indemnidade de doenças estão estabelecidos no Anexo III, Secção 2 do Regulamento Delegado (UE) 2020/689 para a infeção pelo complexo Mycobacterium tuberculosis (Mycobacterium bovis, M. caprae e M. tuberculosis): a intradermotuberculização (IDT) simples e comparada e o teste de gama-interferão. Os protocolos para estes testes são publicados no sítio web da EURL.

Los Programas Nacionales de Erradicación de la Tuberculosis Bovina de ambos países ya contemplan desde hace años el uso de la prueba del interferón gamma como prueba complementaria en rebaños infectados, para acelerar la erradicación de la enfermedad en dichos rebaños. Para ello hay en España dos kits registrados y con puntos de corte validados por el Laboratorio Nacional de Referencia para su uso en España, tras un buen número de años de extenso uso. En Portugal, la aplicación de interferón gamma en rebaños infectados se reanudó en 2022, en áreas de mayor riesgo, y la prueba se realizó en un laboratorio privado reconocido.

Os Programas Nacionais para a Erradicação da Tuberculose Bovina em ambos os países contemplan há anos a utilização do teste de interferão gama como teste complementar em efetivos infetados, a fim de acelerar a erradicação da doença nestes efetivos. Para este fim, existem em Espanha dois kits registados e com pontos de corte validados pelo Laboratório Nacional de Referência para a sua utilização em Espanha, após um bom número de anos de utilização extensiva. Em Portugal a aplicação de gama-interferão em efetivo infetados foi retomado em 2022, em áreas de maior risco, sendo a prova realizada num laboratório privado reconhecido.

La inclusión de esta técnica como prueba de rutina, uso para el cual no ha sido ampliamente testada en las diversas condiciones de campo, crea numerosas incertidumbres en cuanto a su rendimiento en dichas condiciones. Hay que tener en cuenta que los protocolos publicados por el EURL se han basado en la validación de los puntos de corte para la obtención y mantenimiento de la calificación y para la pruebas de movimiento mediante los datos aportados por los fabricantes junto con estudios de prueba realizados por el EURL, junto con los laboratorios nacionales de referencia de los Estados Miembros, cumpliendo los requisitos que se establecieron en la opinión de EFSA (EFSA Journal 2012;10 (12):2975), de forma que la especificidad proporcionada no debía ser inferior a la prueba cutánea de menor especificidad (SIT: 96%) y con una sensibilidad igual o superior a la prueba cutánea de rutina en la Unión Europea (SIT, SICCT).

A inclusão desta técnica como um teste de rotina, para o qual não foi amplamente testada nas várias condições de campo, cria muitas incertezas quanto ao seu desempenho sob estas condições. É de notar que os protocolos publicados pela EURL foram baseados na validação de pontos de corte para a obtenção e manutenção da qualificação e para testes de movimento utilizando dados fornecidos pelos fabricantes juntamente com estudos de teste realizados pela

EURL, em conjunto com os laboratórios nacionais de referência dos Estados-Membros, cumprindo os requisitos estabelecidos no parecer da EFSA (EFSA Journal 2012;10 (12): 2975), para que a especificidade fornecida não seja inferior ao teste cutâneo de menor especificidade (SIT: 96%) e com uma sensibilidade igual ou superior à do teste cutâneo de rotina da UE (SIT, SICCT).

Al tratarse de una prueba de laboratorio, algunos de los puntos críticos que afectan a la sensibilidad de pruebas de campo se ven minimizados. Otra ventaja añadida es que requiere una sola visita a la explotación, si bien se precisa una logística más complicada de remisión de las muestras y de análisis en el laboratorio. No obstante, el hecho de que su uso en animales menores de 6 meses no sea posible, no evita la segunda visita al establecimiento a las 72 horas para la lectura de la IDT en estos animales, lo que transforma parte de la ventaja en inconveniente.

Como se trata de um teste de laboratório, alguns dos pontos críticos que afetam a sensibilidade dos testes de campo são minimizados. Outra vantagem adicional é que requer apenas uma visita ao estabelecimento, embora seja necessária uma logística mais complicada de encaminhamento de amostras e análises laboratoriais. Contudo, o facto de a sua utilização em animais com menos de 6 meses não ser possível não evita uma segunda visita ao estabelecimento após 72 horas para a leitura das IDT a estes animais, o que torna parte da vantagem numa desvantagem.

La utilización del gamma-interferón debe adaptarse al propósito de su uso, como la mayoría de las pruebas, y es importante el punto de corte utilizado, que debe ser validado por la EURL. En nuestra experiencia, cuando ensayamos rebaños con más de 100 vacas sin tuberculosis, siempre tenemos algunos reactores para el gamma-interferón, ya que su especificidad ronda el 97%-99%, pero puede ser inferior, lo que es un inconveniente relevante si la regla es el sacrificio de estos animales y volver a chequear con IDT todo el rebaño. En este caso, para los rebaños que están indemnes y sin factores de riesgo identificados, una de las soluciones podría ser la reevaluación inmediata de sólo los animales gamma-interferón positivos con la IDT y, si esta prueba es negativa, levantar inmediatamente la suspensión del rebaño.

A utilização do gama-interferon deve ser adaptada à finalidade do seu uso, como a maioria dos testes, sendo importante o cut-off utilizado que deverá ser validado pelo EURL. Em nossa experiência, quando testamos rebanhos com mais de 100 vacas sem tuberculose, temos sempre alguns reatores para gama INF uma vez que a sua especificidade é de cerca de 97%-99%, mas pode ser mais baixa, consistindo em relevante inconveniente se a regra for o abate destes animais e a retestagem de todo o efetivo com IDT. Neste caso, para os efetivos indemnes e sem fatores de risco identificados, uma das soluções poderia ser a retestagem imediata de apenas os animais positivos a INF com o IDT e se esta prova resultasse negativo levantar de imediato a suspensão do efetivo.

Como posibles usos iniciales añadidos al de prueba rutinaria (como alternativa a la prueba cutánea en las mismas condiciones que se aplica ésta dentro de nuestros programas nacionales), podrían evaluarse en una primera fase, entre otros: (i) su uso como prueba inicial en serie en unidades epidemiológicas libres de tuberculosis de bajo riesgo (en caso de aparición de un número reducido de reactores de acuerdo con la especificidad esperada, o cuando se sospechen interferencias diagnósticas), principalmente de aptitud lechera, lo que aporta ventajas de tiempo en relación con el uso en serie de las pruebas cutáneas, que requieren un intervalo de al menos 42 días; (ii) su uso como control de calidad de las pruebas de campo, bien cuando se tienen dudas sobre su ejecución o bien dentro de protocolos de control establecidos como son las pruebas de validación (repetición de las pruebas de un % de rebaños determinado); y (iii) su uso como prueba de movimiento (pre,

post) en animales mayores de 6 meses. Estos usos requieren estar protocolizados para asegurar una aplicación homogénea en función de las diferentes situaciones epidemiológicas existentes.

Como possíveis utilizações iniciais para além do teste de rotina (como alternativa ao teste cutâneo nas mesmas condições que o teste cutâneo nos nossos programas nacionais), poderiam ser avaliadas numa primeira fase, entre outras: (i) a sua utilização como teste de série inicial em unidades epidemiológicas livres de tuberculose de baixo risco (em caso de ocorrência de um pequeno número de reagentes de acordo com a especificidade esperada, ou quando há suspeita de interferências diagnósticas), principalmente de aptidão leiteira, o que traz vantagens de tempo em relação à utilização em série de testes cutâneos, que requerem um intervalo de pelo menos 42 dias; (ii) a sua utilização como controlo de qualidade de testes de campo, quer quando existem dúvidas sobre o seu desempenho, quer dentro de protocolos de controlo estabelecidos, tais como testes de validação (repetição de testes numa determinada % de efetivos); e (iii) a sua utilização como teste de movimento (pré, pós) em animais com mais de 6 meses. Estes usos precisam de ser protocolizados para assegurar uma aplicação homogénea de acordo com as diferentes situações epidemiológicas.

Por otro lado, el artículo 9 del Reglamento Delegado (UE) 2020/689 establece las definiciones de caso sospechoso y caso confirmado. Un animal o grupo de animales se define como caso sospechoso si los exámenes clínicos, *post mortem* o de laboratorio concluyen que el signo o signos clínicos, la lesión o lesiones *post mortem* o los hallazgos histológicos son indicativos de dicha enfermedad; o los resultados de un método de diagnóstico indiquen la posible presencia de la enfermedad en una muestra procedente de un animal o grupo de animales; o se haya establecido un vínculo epidemiológico con un caso confirmado.

Além disso, o Artigo 9 do Regulamento Delegado (UE) 2020/689 estabelece as definições de um caso suspeito e confirmado. Um animal ou grupo de animais é definido como um caso suspeito se os exames clínicos, post-mortem ou laboratoriais concluírem que o(s) sinal(s) clínico(s), lesão(ões) post-mortem ou achados histológicos são indicativos de tal doença; ou se os resultados de um método de diagnóstico indicarem a possível presença da doença numa amostra de um animal ou grupo de animais; ou se tiver sido estabelecida uma ligação epidemiológica com um caso confirmado.

Se define como caso confirmado si el agente patógeno ha sido aislado en una muestra procedente de un animal o grupo de animales; o se haya detectado un antígeno o ácido nucleico específicos del agente patógeno en una muestra procedente de un animal o grupo de animales que muestran signos clínicos compatibles con la enfermedad o un vínculo epidemiológico con un caso sospechoso o confirmado; o se ha obtenido un resultado positivo de un método de diagnóstico indirecto en una muestra procedente de un animal o grupo de animales que muestran signos clínicos compatibles con la enfermedad o un vínculo epidemiológico con un caso sospechoso o confirmado.

Um caso confirmado é definido como se o agente patogénico tiver sido isolado numa amostra de um animal ou grupo de animais; ou se um antígeno específico ou ácido nucleico do agente patogénico tiver sido detetado numa amostra de um animal ou grupo de animais que apresentem sinais clínicos consistentes com a doença ou uma ligação epidemiológica a um caso suspeito ou confirmado; ou se tiver sido obtido um resultado positivo de um método de diagnóstico indireto numa amostra de um animal ou grupo de animais que apresentem sinais clínicos consistentes com a doença ou uma ligação epidemiológica a um caso suspeito ou confirmado.

Esta definición hace posible el uso de las pruebas de PCR directas en muestra como prueba confirmatoria sin necesidad de recurrir posteriormente al cultivo, tanto en animales con

resultado positivo a las pruebas de rutina como en animales sacrificados de rutina con lesiones sospechosas en matadero. Para ello la PCR usada debe haberse validado en relación con el cultivo y mostrar un rendimiento equiparable, algo que cumple el procedimiento publicado en la página Web del EURL. Esta posibilidad nos permite acelerar la toma de decisiones para reducir las inmovilizaciones de los rebaños a lo mínimo que sea necesario. En el caso de los animales sacrificados de rutina, su uso junto con otras pruebas que permitan obtener, en su caso, diagnósticos diferenciales, es un objetivo de futuro que además de apoyar nuestra toma de decisiones redundará en una mejora de la eficacia de la vigilancia pasiva.

Esta definição permite utilizar testes PCR diretos em amostras como teste de confirmação sem necessidade de utilização subsequente de cultura, tanto em animais positivos de rotina como em animais abatidos de rotina com lesões suspeitas no abate. Para tal, o PCR utilizado deve ter sido validado contra a cultura e mostrar um desempenho comparável, o que é cumprido pelo procedimento publicado no sítio web da EURL. Esta possibilidade permite-nos acelerar a tomada de decisões para reduzir as detenções do rebanho ao mínimo necessário. No caso de animais abatidos de rotina, a sua utilização em conjunto com outros testes para obter diagnósticos diferenciais, quando apropriado, é um objetivo futuro que não só apoiará a nossa tomada de decisão, mas também melhorará a eficiência da vigilância passiva.

La vigilancia pasiva es una parte fundamental para demostrar la eficacia de las medidas de control que estamos aplicando con el uso y frecuencia de las pruebas rutinarias de diagnóstico o para demostrar la ausencia de la enfermedad en zonas declaradas como libres, donde se reduce la frecuencia de las pruebas o incluso se eliminan. Conocidas son las limitaciones de eficacia que tiene esta vigilancia, que se manifiestan en la baja tasa de remisión de granulomas de buen número de mataderos y en que cada vez está más basada en la inspección *post-mortem* “visual only”, lo que hace recomendable incrementar esfuerzos para mejorar su sensibilidad con el fin de compensar la disminución de la misma en las pruebas de rutina utilizadas, tanto en el tipo como en la frecuencia. No debemos olvidar que el anexo IV del Reglamento Delegado (UE) 2020/689 condiciona tanto la concesión como el mantenimiento del estatuto de libre de infección por el CMTB a una zona a la aplicación los requisitos generales de vigilancia para la detección de la infección por el CMTB en bovinos en cautividad y que incluya, como mínimo, la búsqueda sistemática de lesiones características de la infección por el CMTB mediante vigilancia *ante y post mortem* de todos los bovinos sacrificados y la investigación de las lesiones que pudieran deberse a la infección por el CMTB.

A vigilância passiva é uma parte fundamental para demonstrar a eficácia das medidas de controlo que estamos a aplicar com a utilização e frequência dos testes de diagnóstico de rotina ou para demonstrar a ausência da doença em áreas declaradas como livres, onde a frequência dos testes é reduzida ou mesmo eliminada. As limitações desta vigilância em termos de eficácia são bem conhecidas, como o demonstra a baixa taxa de remissão de granulomas num bom número de matadouros e o facto de se basear cada vez mais na inspeção post-mortem "apenas visual", o que torna aconselhável aumentar os esforços para melhorar a sua sensibilidade a fim de compensar a diminuição da sensibilidade nos testes de rotina utilizados, tanto no tipo como na frequência. Não se deve esquecer que o Anexo IV do Regulamento Delegado (UE) 2020/689 condiciona a concessão e manutenção do estatuto de zona livre de infeção por CMTB a uma aplicação de requisitos gerais de vigilância para a deteção da infeção por CMTB em bovinos em cativeiro e incluindo, no mínimo, a busca sistemática de lesões características da infeção por CMTB através da vigilância ante e post mortem de todos os bovinos abatidos e a investigação de lesões que possam ser devidas à infeção por CMTB.

Una medida de refuerzo que está demostrando ser altamente eficaz para mejorar la vigilancia pasiva consiste en considerar determinados animales como “de seguimiento” en

base a sus antecedentes, tanto en su historial sanitario de rebaño como de los resultados a las pruebas de rutina realizadas. Nos referimos tanto a los animales que estuvieron presentes en algún momento en establecimientos infectados como a los animales reaccionantes a la ppd bovina cuando se usa la prueba cutánea comparada. En España estos animales son muestreados cuando son sacrificados de rutina y nos permiten detectar algunos focos que no hemos detectado mediante las pruebas de la vigilancia activa. Una cuestión que nos surge, en base a la experiencia adquirida en estos años, es cuándo debemos considerar como sospechoso a un animal que nos reacciona más de una vez a la ppd bovina en pruebas sucesivas.

Uma medida de reforço que se está a revelar altamente eficaz na melhoria da vigilância passiva é considerar certos animais como "acompanhamento" com base na sua história, tanto na sua história sanitária do rebanho como nos resultados dos testes de rotina. Referimo-nos tanto a animais que estiveram sempre presentes em instalações infetadas como a animais que reagiram ao ppd bovino quando o teste cutâneo comparativo é utilizado. Em Espanha estes animais são amostrados quando são abatidos rotineiramente e permitem-nos detetar alguns surtos que não detetámos através de testes de vigilância ativa. Uma questão que se levanta, com base na experiência adquirida ao longo dos anos, é quando devemos considerar como suspeito um animal que reage mais de uma vez ao ppd bovino em testes sucessivos.

La prevención, la bioseguridad y las medidas de control de enfermedades son pilares clave de la AHL para prevenir la infección o re-infección por el CMTB y para contener la propagación en y desde los establecimientos infectados. Ello implica el refuerzo de las medidas de bioseguridad tanto en las explotaciones infectadas para reducir la contaminación ambiental y el riesgo para los rebaños vecinos como en las explotaciones no infectadas para limitar el riesgo de introducción. La bioseguridad adquiere especial relevancia en el caso de los rebaños en extensivo ubicados en zonas de riesgo de tuberculosis en fauna silvestre, donde es necesario avanzar en la aplicación efectiva de auditorias de bioseguridad, basadas en la excelente evidencia científica transferida por los equipos de investigación de la península ibérica, y transferida significa aplicada y evaluada en el campo por distintos Grupos Operativos.

As medidas de prevenção, biossegurança e controlo de doenças são pilares fundamentais da LSA para prevenir a infeção ou reinfeção por CMTB e para conter a propagação dentro e a partir de instalações infetadas. Isto implica reforçar as medidas de biossegurança tanto nas explorações infetadas para reduzir a contaminação ambiental e o risco para os rebanhos vizinhos como nas explorações não infetadas para limitar o risco de introdução. A biossegurança é particularmente relevante no caso de rebanhos extensivos localizados em zonas de risco de tuberculose na fauna selvagem, onde é necessário avançar na aplicação efetiva de auditorias de biossegurança, com base na excelente evidência científica transferida por equipas de investigação na Península Ibérica, e meios transferidos aplicados e avaliados no terreno por diferentes Grupos Operacionais.

Estas auditorias o evaluaciones, protocolizadas en base a toda esta experiencia científica (y que en el caso de España serán implementadas a través de una App), permitirán la aplicación de medidas específicas consideradas como "buenas prácticas", adaptadas a cada establecimiento y que sean aplicables para los titulares de las explotaciones con el mejor coste-eficacia. Su realización requiere una formación específica y continuada, tanto de los profesionales que las realicen como de los Servicios Veterinarios Oficiales que tengan la responsabilidad de, junto dichos profesionales y los titulares de la explotación, confirmar la idoneidad de las medidas propuestas para gestionar los principales riesgos identificados, la posibilidad de su aplicación efectiva y el calendario previsto para su aplicación. Esta formación continuada es complementaria a la que se recibe por todos los profesionales que intervienen en el programa de erradicación para la ejecución de las pruebas de campo. En

el caso de Portugal, se espera que las “visitas sanitarias” en el ámbito de los artículos 10 y 25 de la LSA permitan una evaluación inicial de las condiciones de bioseguridad de los establecimientos ganaderos, conduciendo posteriormente a la mejora de las condiciones, según sus riesgos sanitarios.

Estas auditorias ou avaliações, protocolizadas com base em toda esta experiência científica (e que no caso de Espanha serão implementadas através de uma App), permitirão a aplicação de medidas específicas consideradas como "boas práticas", adaptadas a cada estabelecimento e que são aplicáveis aos proprietários agrícolas com a melhor relação custo-eficácia. A sua implementação requer uma formação específica e contínua, tanto para os profissionais que os executam como para os Serviços Veterinários Oficiais responsáveis por confirmar, juntamente com estes profissionais e os proprietários agrícolas, a adequação das medidas propostas para gerir os principais riscos identificados, a possibilidade da sua implementação efetiva e o calendário previsto para a sua aplicação. Esta formação contínua é complementar à formação recebida por todos os profissionais envolvidos no programa de erradicação para a implementação dos ensaios de campo. No caso de Portugal prevê-se que as "visitas sanitárias" enquadradas nos artigos 10º e 25º da LSA permitam uma avaliação inicial das condições de biossegurança dos estabelecimentos pecuários, levando posteriormente à melhoria das condições, de acordo com os seus riscos sanitários.

En el año 2017 se publicó el PATUBES en España, gracias a la implicación de las distintas administraciones públicas y los grupos de investigación. Este libro blanco requería de legislación específica para posibilitar su aplicación, que en un primer momento se centró en la gestión de los subproductos de la caza a través de normativas autonómicas y del Real Decreto 50/2018. Posteriormente, el Real Decreto 138/2020 estableció la normativa básica en materia de actuaciones sanitarias en especies cinegéticas que actúan como reservorio del CMT. Tras su publicación hay actuaciones ya implementadas y otras pendientes de implementar.

Em 2017, Espanha publicou o PATUBES, graças ao envolvimento das diferentes administrações públicas e grupos de investigação. Este Livro Branco exigiu legislação específica para permitir a sua aplicação, que inicialmente se centrou na gestão dos subprodutos da caça através de regulamentos regionais e do Decreto Real 50/2018. Posteriormente, o Decreto Real 138/2020 estabeleceu os regulamentos básicos sobre ações sanitárias em espécies cinegéticas que atuam como reservatório de CMTB. Na sequência da sua publicação, algumas ações já foram implementadas e outras estão pendentes de implementação.

En España, desde 2020 se actualiza la categorización por riesgo de las distintas comarcas veterinarias y se está finalizando la de los distintos terrenos cinegéticos. La combinación de ambas categorizaciones según su riesgo es la base para establecer los requisitos y obligaciones que se establecen en esta norma, tanto para las autoridades competentes en sanidad animal como para las competentes en caza y medio ambiente. El mayor reto pendiente para posibilitar el cumplimiento integral de la norma y poder monitorizar sus resultados, es el de aplicar de forma efectiva el concepto “One Health” en este ámbito tanto, a nivel nacional como regional y local, de forma que las medidas a acometer se apliquen de forma coordinada en el tiempo y con la implicación de todos los interesados en sus respectivas competencias.

En Portugal, se creó en 2022 un grupo de trabajo sobre tuberculosis bovina, integrado por los servicios veterinarios centrales y regionales, los servicios de conservación ambiental con competencias en materia de caza, el laboratorio nacional de referencia, las organizaciones de productores ganaderos y de cazadores y los propietarios rurales. Este grupo tiene como objetivo definir una estrategia para reforzar la erradicación de la

tuberculosis y las prioridades de actuación en las zonas de riesgo definidas o a redefinir, donde *M. bovis* circula dentro y entre poblaciones de ganado y animales de caza mayor.

*Em Espanha, desde 2020, a categorização do risco dos diferentes distritos veterinários foi atualizada e a categorização dos diferentes locais de caça está a ser finalizada. A combinação de ambas as categorizações de acordo com o risco é a base para estabelecer os requisitos e obrigações estabelecidos no presente regulamento, tanto para as autoridades competentes em matéria de saúde animal como para as autoridades competentes em matéria de caça e ambiente. O maior desafio a enfrentar para permitir o pleno cumprimento da norma e poder monitorizar os seus resultados é aplicar eficazmente o conceito "Uma Saúde" nesta área a nível nacional, regional e local, para que as medidas a tomar sejam aplicadas de forma coordenada ao longo do tempo e com o envolvimento de todas as partes interessadas nas suas respetivas áreas de competência. Em Portugal foi instituído em 2022 um grupo de trabalho para a tuberculose bovina constituído pelos serviços veterinários centrais e regionais, os serviços de conservação do ambiente com responsabilidades sobre a caça, o laboratório nacional de referência, as organizações de produtores pecuários e as organizações de caçadores e de proprietários rural. Este grupo tem como objetivo definir uma estratégia para a reforçar a erradicação da tuberculose e as prioridades de atuação em zonas de risco a definir ou redefinir, onde *M. bovis* circula dentro e entre as populações de bovinos e animais de caça maior.*

Como “buenas prácticas” de tipo general, aplicables a cualquier zona donde existan reservorios de especies cinegéticas, además de la gestión de los subproductos de la caza, figuran la intensificación de la vigilancia en poblaciones no naturales (manejadas) o la incompatibilidad de criar ganado junto con estas especies cuando éstas se manejan mediante vallados cinegéticos y alimentación suplementaria sistemática, la prohibición de dicha alimentación sistemática en poblaciones naturales, alimentación que debe ser limitada a situaciones concretas, previamente valoradas, comprobadas y autorizadas por las autoridades cinegéticas. Además, cuando se proporciona dicha alimentación autorizada, ésta debe ser realizada en comederos selectivos para estas especies, y si en el terreno cinegético existe además ganado, éste contar igualmente con comederos y bebederos selectivos a los que no puedan acceder las especies cinegéticas, y viceversa. Los movimientos de animales de estas especies cinegéticas para repoblación o gestión cinegética deben ser adaptados en función del riesgo del terreno cinegético y de la zona donde se ubique.

As "boas práticas" gerais, aplicáveis a qualquer área onde existam reservatórios de espécies cinegéticas, para além da gestão dos subprodutos da caça, são a intensificação da vigilância em populações não naturais (geridas) ou a incompatibilidade da criação de gado juntamente com estas espécies quando estas são geridas através de cercas de caça e alimentação suplementar sistemática, a proibição de tal alimentação sistemática em populações naturais, alimentação que deve ser limitada a situações específicas, previamente avaliadas, verificadas e autorizadas pelas autoridades cinegéticas. Além disso, quando essa alimentação autorizada é fornecida, deve ser efetuada em comedouros seletivos para estas espécies, e se houver também gado no terreno de caça, devem também dispor de comedouros seletivos e bebedouros não acessíveis às espécies cinegéticas, e vice-versa. A circulação de animais destas espécies de caça para repovoamento ou gestão cinegética deve ser adaptada de acordo com o risco do terreno de caça e da área onde se encontra.

En zonas de riesgo, deben reforzarse las condiciones de bioseguridad de las explotaciones de ganado bovino, en especial en lo relativo a cerramientos; la limpieza y desinfección de instalaciones; el diseño, la limpieza y la desinfección de comederos y bebederos; y la limitación de acceso de los animales silvestres a las instalaciones habitualmente utilizadas por el ganado y a los almacenes de alimento, principalmente paja y heno.

Nas zonas de risco, as condicións de biossegurança nas exploracións de gado deberían ser reforçadas, en particular no que diz respeito aos recintos; limpeza e desinfección das instalacións; concepción, limpeza e desinfección dos comedouros e bebedouros; e limitación do acceso dos animais selvagens às instalacións normalmente utilizadas polo gado e aos armazéns de alimentación, principalmente palha e feno.

En España, entre las cuestiones pendientes de implementar o cuyo grado de implementación no es homogéneo se encuentra el inicio de la realización de las auditorías de bioseguridad en las comarcas de especial riesgo, o la inclusión de planes sanitarios dentro de los planes técnicos de caza en terrenos con especies cinegéticas reservorio manejadas, o la inclusión de estimas de abundancia y medidas sanitarias acordes en dichos planes técnicos en zonas de riesgo.

Em Espanha, de entre as questões pendentes de implementação ou cujo grau de implementação não é homogéneo estão o início de auditorias de biossegurança nas áreas de risco especial, ou a inclusão de planos sanitários nos planos técnicos de caça em áreas com espécies cinegéticas reservatório geridas, ou a inclusão de estimativas de abundância e medidas sanitárias nestes planos técnicos em áreas de risco.

Todas estas cuestiones, especialmente estas últimas, requieren una estrecha colaboración entre las autoridades competentes implicadas y un plan de monitorización y control de su implementación para asegurar su efectividad, mediante la aplicación de las medidas correctoras que sean necesarias. Además, requiere un plan de comunicación común para los sectores productivos afectados que posibilite que la bioseguridad y la prevención sean percibidas como un complemento imprescindible, beneficioso y necesario dentro de los programas de control y erradicación de la enfermedad es las distintas especies animales.

Todas estas questões, especialmente estas últimas, requerem uma estreita colaboração entre as autoridades competentes envolvidas e um plano de monitorização e controlo da sua implementação para assegurar a sua eficácia, através da aplicação das medidas corretivas necessárias. Além disso, requer um plano de comunicação comum para os sectores produtivos afetados para assegurar que a biossegurança e a prevenção sejam vistas como um complemento essencial, benéfico e necessário aos programas de controlo e erradicação de doenças nas diferentes espécies animais.

Bibliografía:

La legislación a que se refiere el texto.

Diagnóstico de tuberculosis bovina. Dilema entre tradición y vanguardia

Javier Bezós^{1,2*}, Julio Álvarez^{1,2}, Beatriz Romero^{1,2}, Lucas Domínguez^{1,2}, Lucía de Juan^{1,2}

¹Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.

²Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España.

jbezosga@ucm.es

Actualmente, el diagnóstico de la tuberculosis en animales continúa siendo un desafío, lo que afecta en gran medida al proceso de control y erradicación de la enfermedad. En el ganado bovino y otras especies de mamíferos, tanto domésticas como silvestres, el diagnóstico *ante mortem* se ha basado tradicionalmente en la inoculación intradérmica de un derivado proteico purificado de *Mycobacterium bovis* (PPD bovina) que desencadena una reacción de hipersensibilidad retardada en los animales infectados. Esta prueba, conocida como prueba de intradermotuberculinización (IDTB) o “prueba de la tuberculina”, se ha erigido como prueba oficial en la mayor parte de países del mundo debido a su considerable sensibilidad (especialmente a nivel de rebaño) y especificidad (mayor aun cuando se aplica la prueba comparada empleando adicionalmente PPD aviar). Su aplicación ha permitido, junto a otras medidas, erradicar la enfermedad en varios países y reducir de forma significativa la prevalencia de la enfermedad en otros entre los que se incluye España, donde se ha alcanzado ya en algunas regiones el estatus de oficialmente indemnes. A ello ha contribuido también la implementación de la prueba de detección de interferón-gamma (IFN- γ) en rebaños infectados con objeto de maximizar la sensibilidad, usada en España desde el año 2006 de forma paralela a la IDTB. Sin embargo, estas técnicas diagnósticas no son perfectas en términos de sensibilidad (especialmente a nivel individual en el caso de la IDTB) y especificidad (principalmente en el caso de la prueba de IFN- γ), y estas limitaciones se agudizan en ciertas situaciones epidemiológicas concretas, lo que dificulta determinar el verdadero estatus de infección de los animales y, por tanto, ralentiza la erradicación (1,2).

La respuesta inmunitaria frente a la tuberculosis es compleja y se ve afectada por factores individuales. La existencia de una fase de latencia tras la infección ha sido relacionada con una mayor dificultad para diagnosticar la infección en personas y animales (3). Asimismo, existen factores técnicos relacionados con las metodologías que pueden tener un efecto significativo en los resultados diagnósticos, aspecto en el que se centra el planteamiento de esta presentación. En los últimos años han sido numerosas las publicaciones (4-8) y proyectos de investigación dirigidos a desentrañar de forma específica el efecto de estos factores, lo que ha permitido definir los protocolos y estrategias de aplicación que permiten unos resultados óptimos. La nueva Ley de Sanidad Animal (Reglamento UE 2016/429), de reciente aplicación, conlleva algunas novedades desde el punto de vista del diagnóstico *ante mortem* de la tuberculosis, estableciendo la necesidad de seguir protocolos específicos al emplear las técnicas oficiales para permitir movimientos dentro de la UE o para declarar el estatus de libre de tuberculosis bovina en las explotaciones ganaderas. Precisamente, las investigaciones anteriormente comentadas han

sido de gran utilidad para definir estos protocolos por parte del Laboratorio Europeo de Referencia (EU-RL) de Tuberculosis Bovina (9).

En España, la prevalencia de tuberculosis bovina descendió de forma significativa durante los primeros años de aplicación del programa de erradicación para entrar posteriormente en un periodo de descenso más moderado a partir del año 2005-2006. Aunque esta evolución se debe a diferentes aspectos, atendiendo únicamente a lo relativo al diagnóstico es lógico pensar que, en los primeros años de aplicación del programa, cuando la prevalencia de tuberculosis bovina era muy elevada, podía ser más sencillo detectar los animales infectados, dificultándose esta tarea a medida que la prevalencia disminuía y teniendo en cuenta las ya conocidas limitaciones de sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas oficiales. La importancia de realizar correctamente el diagnóstico, especialmente *in vivo*, se puso especialmente de manifiesto en España a partir del año 2013, cuando se comenzaron a realizar los cursos de formación y actualización en tuberculosis bovina para el personal involucrado en el programa de erradicación, lo que se tradujo en un incremento significativo de la prevalencia en los años posteriores debido muy probablemente a un aumento de la sensibilidad diagnóstica que permitió un aumento en la detección de tuberculosis residual ya existente, alcanzando de nuevo este indicador la senda del descenso a partir del año 2017 (10).

El objetivo de erradicar la tuberculosis bovina en España se ha visto recientemente actualizado al establecerse un periodo máximo para alcanzarlo, concretamente el año 2030 (11). Junto al desafío que puede suponer un objetivo hasta cierto punto ambicioso como este hay que destacar un cambiante contexto socio-económico, lo cual se ha visto reflejado en una cofinanciación del programa por parte de la UE cada vez menor, estando previsto el cese de esta cofinanciación a partir del año 2023. Estos dos hechos son muy relevantes pues lógicamente hacen plantearnos las posibilidades de éxito para alcanzar el ambicioso objetivo planteado empleando las técnicas y estrategias diagnóstica actuales, las cuáles a su vez se han podido mantener en el tiempo gracias a dicha cofinanciación.

La eficacia del programa de erradicación de tuberculosis bovina para España ha sido evaluada en su conjunto por el subgrupo de Tuberculosis Bovina de la *Task Force* (DG SANTE) y en diversos estudios, confirmando que la estrategia seguida en España y definida en el programa de erradicación es la más adecuada para alcanzar los objetivos (12). Sin embargo, respecto a las técnicas diagnósticas *per se*, se sigue investigando para su mejora en términos de rendimiento, así como en el desarrollo de nuevas herramientas que puedan ser una alternativa mejor en el futuro. Como ya se ha comentado anteriormente, el empleo de la tuberculina o PPD es la base de las pruebas diagnósticas oficiales actuales, un reactivo eminentemente de naturaleza proteica pero que contienen multitud de componentes de diferente naturaleza y del que hasta hace poco tiempo se desconocía su composición exacta, a pesar de que se viene utilizando desde hace prácticamente un siglo (13). La composición y calidad de las PPDs dependen del proceso de fabricación (existen multitud de fabricantes en Europa) y están relacionadas directamente con el rendimiento de las pruebas diagnósticas. Por ejemplo, su limitada especificidad se debe a la existencia en su composición de antígenos presentes tanto en micobacterias tuberculosas como no tuberculosas, razón por la que se trabaja en el desarrollo de reactivos que puedan sustituir a las PPDs tradicionales y que potencialmente detecten animales con tuberculosis sin desencadenar reactividad en aquellos expuestos a otras micobacterias no tuberculosas (14). Estos reactivos, que se comenzaron a desarrollar hace más de 20 años con el objetivo de poder diferenciar animales vacunados con BCG de animales infectados, se han ido mejorando con el tiempo para su potencial uso como sistema para incrementar la especificidad diagnóstica, tanto en pruebas de base celular como humoral, pero sin un detrimento significativo de la sensibilidad (15)(Figura 1). Precisamente la menor sensibilidad atribuida a priori a las técnicas basadas en estos antígenos alternativos ha sido

la principal razón, junto a un mayor coste (razón que no debe obviarse) para que su uso no se haya extendido. En cualquier caso, existe una carencia importante de estudios sobre su empleo a gran escala y en diferentes situaciones epidemiológicas que permita determinar con mayor precisión su rendimiento, como ya adelantaba una opinión de la EFSA publicada en el año 2012 (16). Como ejemplo, en España prácticamente todos los estudios en los que se han empleado estos reactivos para el diagnóstico son experimentales, en pruebas *in vitro* (técnica de IFN- γ) en un número limitado de animales y en gran medida en ganado caprino (17,18), lo que directamente nos lleva a pensar en la necesidad de generar datos a gran escala con las mezclas antigénicas más actuales y en distintos contextos (presencia de tuberculosis, regiones libres, etc.) para poder así extraer conclusiones que sirvan de base para determinar su utilidad en el futuro. Otros países sí disponen de mayor información sobre su uso en ganado bovino (19), pero como ya se ha demostrado, extrapolar directamente los resultados de estas y otras pruebas realizadas en situaciones epidemiológica diferentes no parece la mejor opción, al no reflejar lo que podría observarse al aplicarlos en nuestro país. Por tanto, con los datos en la mano se podrá decidir sobre su uso, teniendo en cuenta que en el lado de la balanza que promueve el empleo de estas mezclas antigénicas habrá aspectos muy importantes, como la posibilidad de utilizar productos de composición y calidad definida y homogénea que podrán potencialmente incrementar la especificidad de las pruebas diagnósticas sin reducir de forma significativa la sensibilidad. Aparte, se podría reducir el empleo de animales de experimentación para la determinación de la potencia biológica en cobayas de las PPDs empleadas en Europa, prueba que no está bien estandarizada y cuyos resultados parecen no ser siempre indicativos de la calidad final del producto y que además conlleva el uso y posterior sacrificio de miles de cobayas anualmente al no existir métodos alternativos validados (20). Este último aspecto es muy importante, y por ello la comunidad científica tendría que adelantarse en la búsqueda de posibles alternativas o la validación de técnicas que permitan minimizar el uso de animales de experimentación antes de que la legislación sobre bienestar animal, cada vez más restrictiva, nos obligue a ello sin disponer de opciones previamente validadas.

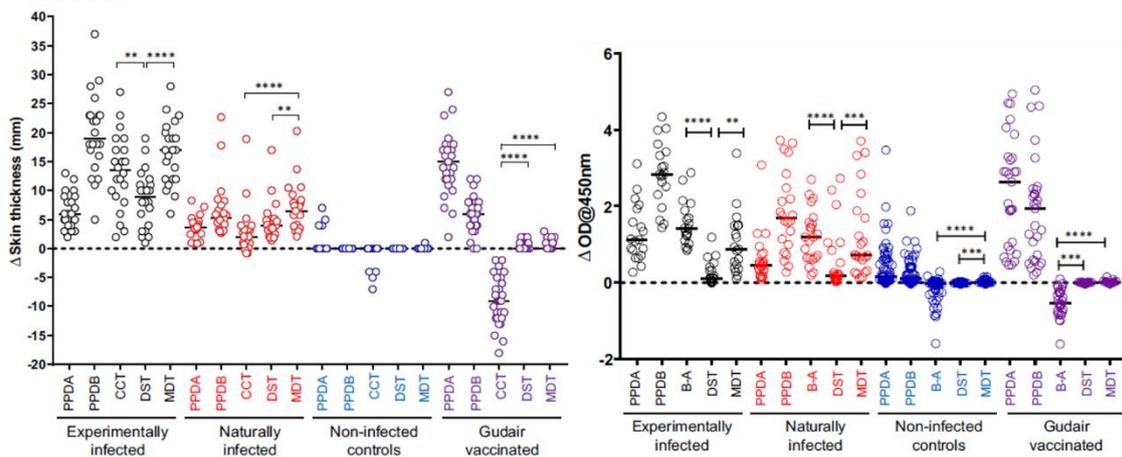


Figura 1. Reactividad observada en la prueba de intradermotuberculinización (izquierda) y de detección de IFN- γ (derecha) empleando PPD bovina (PPDB) y aviar (PPDA), IDTB comparada (CCT), antígenos DIVA para diferenciación de animales vacunados e infectados con BCG (DST) y antígenos de composición definida para diagnóstico de tuberculosis bovina (MDT) en diferentes grupos de animales: 1. Infectados experimentalmente. 2. Infectados naturalmente. 3. Controles no infectados. 4. Vacunados de paratuberculosis (de izquierda a derecha). Imagen extraída del estudio de Middleton y colaboradores, 2021 (15).

Las pruebas de diagnóstico basadas en la detección de anticuerpos se han utilizado ampliamente para el diagnóstico de la tuberculosis en animales desde hace más de una década, sobre todo en aquellas especies no sometidas a programas de erradicación, por su versatilidad, buena relación coste-beneficio y la imposibilidad de aplicar en algunas de estas especies pruebas de base celular (1). En ganado bovino, el rendimiento de estas pruebas ha

sido, en general, bastante limitado, especialmente en términos de sensibilidad, posiblemente debido a la elevada presión diagnóstica a la que está sometido como consecuencia del programa de erradicación, lo que conlleva que la mayor parte de los animales infectados se encuentren probablemente en fases recientes de la misma con la consiguiente repercusión en los títulos de anticuerpos. Por otro lado, se ha teorizado sobre el efecto que podrían tener las tuberculizaciones sucesivas en esta especie, sin que se haya podido demostrar fehacientemente que este hecho tenga un efecto significativo en el rendimiento de estas pruebas de base humoral. A pesar de lo comentado anteriormente, el uso de pruebas de detección de anticuerpos, sin ser oficiales en ganado bovino, se ha recomendado en determinadas situaciones epidemiológicas, como complemento de las pruebas oficiales o ante la sospecha de presencia de animales anérgicos, para lo que existe un protocolo de aplicación recomendado en las diferentes Comunidades Autónomas en España (21). Además, alguna de las mezclas antigénicas anteriormente comentadas para las pruebas de base celular u otras similares pueden tener su aplicación también como base de técnicas de base humoral para mejorar el rendimiento (13,22). Si bien este tipo de técnicas de detección de anticuerpos también tienen limitaciones ya conocidas, investigaciones dirigidas a su mejora son necesarios para contemplar su posible uso en situaciones epidemiológicas o socio-económicas determinadas por su elevada especificidad y su adecuada relación coste-beneficio, como se ha demostrado por ejemplo en ganado caprino en España o en bovino en otros países (23, 24).

Más allá de las técnicas de base celular y humoral comentadas anteriormente (basadas en el uso de PPDs u otros antígenos específicos), son pocas las alternativas existentes actualmente para el diagnóstico *ante mortem* de la tuberculosis bovina, la mayor parte de ellas experimentales basadas en diferentes marcadores previamente identificados (25). De hecho, la mayor parte de estas nuevas técnicas no se encuadrarían en la clasificación tradicional que las divide en pruebas de base celular o humoral, pues se basan en otros mecanismos como el empleo de bacteriófagos (*Actiphage*) o técnicas de citometría de flujo o metabolómica mediante resonancia magnética nuclear (MNR) (26-28) (Figura 2). Los resultados de algunas de estas técnicas, empleadas previamente en medicina humana, han sido, en mayor o menor medida, prometedores, lo que ha suscitado cierto interés de cara a seguir desarrollándolas y evaluándolas. Sin embargo, como ya se ha comentado para el tema de los antígenos alternativos a las PPDs (mucho más estudiado en comparación), es necesario seguir con su puesta a punto y generar datos de su uso en diferentes situaciones epidemiológicas (diferentes razas/aptitudes, poblaciones con distinta prevalencia de la infección, etc.) que permita dilucidar si son técnicas que puedan ser una alternativa “real” en el futuro. Por lo que se conoce de algunas de ellas, actualmente parece difícil pensar en este tipo de pruebas como una alternativa fiable a lo ya utilizado para diagnóstico de la tuberculosis bovina, pues los elevados costes y requerimientos técnicos junto a la escasez de resultados (o incluso el basarse en fundamentos puestos en entredicho por la comunidad científica, como en el caso de *Actiphage*), las alejan de esa posibilidad. Las plataformas basadas en la detección de múltiples citoquinas simultáneamente (29-31) parecen una de las opciones más prometedoras para incrementar la sensibilidad diagnóstica, pues incluyen marcadores que se expresan preferentemente en personas y animales con infección latente (3), que podrían no reaccionar convenientemente a la clásica IDTB o la prueba de detección de IFN- γ . No hay que olvidar que en lo relativo a avances científicos y técnicos el tiempo transcurre rápido y lo que ahora posiblemente puede parecer una opción remota puede ser algo realista dentro de una década. Las técnicas basadas en el empleo de bacteriófagos y NMR tienen margen de mejora, pero traen también consigo algunas ventajas manifiestas además de la propias de toda técnica laboratorial *in vitro*, como no requerir de estimulaciones antigénicas y la posibilidad de aplicarse potencialmente en multitud de especies animales sin necesidad de reactivos específicos. Técnicas como la de detección de IFN- γ , que comenzó a desarrollarse en 1990 pero cuya implantación en España se demoró 16 años, continúa todavía bajo estudio (basta con comprobar los trabajos publicados

anualmente basados en su uso para comprobarlo) y continuas validaciones (por la diversidad de pruebas comerciales y protocolos existentes). Incluso la extracción directa y PCR en tiempo real como prueba *post mortem* posiblemente también fuese considerada en su origen una opción difícil de asumir para el diagnóstico rutinario. Sin embargo, las investigaciones para su continua mejora, el abaratamiento de los costes, la existencia de laboratorios cada vez mejor dotados técnicamente y, por supuesto, la realización de numerosos estudios para determinar su rendimiento son los que permitieron finalmente integrarlas en las estrategias diagnósticas actuales de los programas de erradicación de tuberculosis bovina en muchos países.

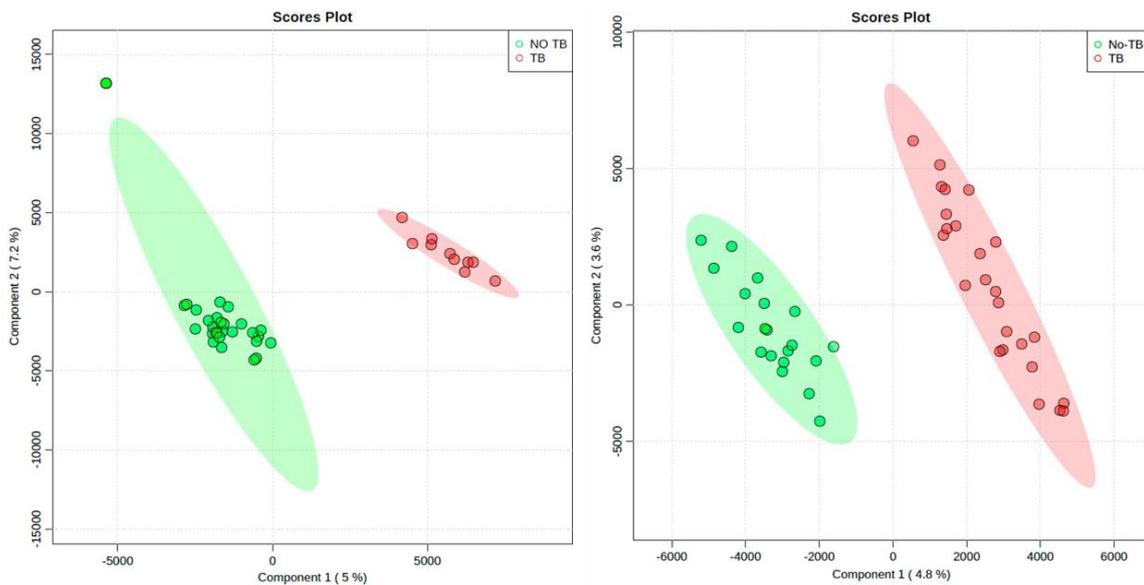


Figura 2. Representación gráfica (R software) del análisis de discriminación de ganado bovino infectado de tuberculosis (rojo) y sano (verde) con base al espectro obtenido a partir del plasma analizado mediante resonancia magnética nuclear de campo bajo (LF-NMR, izquierda) y alto (HF-NMR, derecha). Para el análisis se tienen en cuenta dos componentes (Component 1 y 2) que se constituyen por los denominados *loadings* (cambios en la composición química) y *scores* (concentración de los metabolitos). Imagen extraída del estudio de Ruiz-cabello y colaboradores, 2021 (28).

El diagnóstico es uno de los aspectos de la tuberculosis bovina en los que más se investiga, aunque la mayor parte de los estudios van dirigidos a determinar el rendimiento de las pruebas ya existentes. A pesar de que las técnicas actuales han demostrado ser eficaces no están exentas de limitaciones. La situación epidemiológica y el contexto socio-económico que vivimos es cambiante y es necesario desarrollar y evaluar nuevas técnicas que permitan adaptar las estrategias diagnósticas a esas nuevas circunstancias que puedan presentarse en el futuro.

Bibliografía:

1. Bezós J, Casal C, Romero B, Schroeder B, Hardegger R, Raeber AJ, López L, Rueda P, Domínguez L. Current ante mortem techniques for diagnosis of bovine tuberculosis. *Res Vet Sci.* 2014 Oct;97 Suppl:S44-52. doi: 10.1016/j.rvsc.2014.04.002. Epub 2014 Apr 14. PMID: 24768355.
2. Roy A, Infantes-Lorenzo JA, de la Cruz ML, Domínguez L, Álvarez J, Bezós J. Accuracy of tuberculosis diagnostic tests in small ruminants: A systematic review and meta-analysis. *Prev Vet Med.* 2020 Sep;182:105102. doi: 10.1016/j.prevetmed.2020.105102. Epub 2020 Jul 26. PMID: 32739695.
3. Alvarez AH. Revisiting tuberculosis screening: An insight to complementary diagnosis and prospective molecular approaches for the recognition of the dormant TB infection in human and cattle hosts. *Microbiol Res.* 2021 Nov;252:126853. doi: 10.1016/j.micres.2021.126853. Epub 2021 Aug 26. PMID:34536677.
4. Casal C, Alvarez J, Bezós J, Quick H, Díez-Guerrier A, Romero B, Saez JL, Liandris E, Navarro A, Perez A, Domínguez L, de Juan L. Effect of the inoculation site of bovine purified protein derivative (PPD)

- on the skin fold thickness increase in cattle from officially tuberculosis free and tuberculosis-infected herds. *Prev Vet Med.* 2015 Sep 1;121(1-2):86-92. doi: 10.1016/j.prevetmed.2015.07.001. Epub 2015 Jul 6. PMID: 26189005.
5. de Lisle GW, Green RS, Buddle BM. Factors affecting the gamma interferon test in the detection of bovine tuberculosis in cattle. *J Vet Diagn Invest.* 2017 Mar;29(2):198-202. doi: 10.1177/1040638716689114. Epub 2017 Feb 8. PMID: 28176607.
 6. Roy A, Díez-Guerrier A, Ortega J, de la Cruz ML, Sáez JL, Domínguez L, de Juan L, Álvarez J, Bezós J. Evaluation of the McIntock syringe as a cause of non-specific reactions in the intradermal tuberculin test used for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Res Vet Sci.* 2019 Feb;122:175-178. doi: 10.1016/j.rvsc.2018.11.025. Epub 2018 Nov 29. PMID: 30529272.
 7. Ortega J, Infantes-Lorenzo JA, Roy A, de Juan L, Romero B, Moreno I, Domínguez M, Domínguez L, Bezós J. Factors affecting the performance of P22 ELISA for the diagnosis of caprine tuberculosis in milk samples. *Res Vet Sci.* 2022 Jul;145:40-45. doi: 10.1016/j.rvsc.2022.02.008. Epub 2022 Feb 6. PMID: 35151157.
 8. Ortega J, Roy A, Álvarez J, Sánchez-Cesteros J, Romero B, Infantes-Lorenzo JA, Sáez JL, López M, Domínguez L, de Juan L, Bezós J. Effect of the Inoculation Site of Bovine and Avian Purified Protein Derivatives (PPDs) on the Performance of the Intradermal Tuberculin Test in Goats From Tuberculosis-Free and Infected Herds. *Front Vet Sci.* 2021 Aug 27;8:722825. doi: 10.3389/fvets.2021.722825. PMID: 34513976; PMCID: PMC8429842.
 9. Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria. [Accessed: 4 Nov 2022]. Available at <https://www.visavet.es/bovinetuberculosis/databases/bt-protocols.php>
 10. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. [Accessed: 4 Nov 2022]. Available at https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/programatb2022_tcm30-583922.pdf
 11. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. [Accessed: 4 Nov 2022]. Available at https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/spainmtceradicationprogramme2022-2030final_tcm30-619674.pdf
 12. de la Cruz ML, Pozo P, Grau A, Nacar J, Bezós J, Perez A, Dominguez L, Saez JL, Minguez O, de Juan L, Alvarez J. Assessment of the sensitivity of the bovine tuberculosis eradication program in a high prevalence region of Spain using scenario tree modeling. *Prev Vet Med.* 2019 Dec 1;173:104800. doi: 10.1016/j.prevetmed.2019.104800. Epub 2019 Oct 18. PMID: 31704560.
 13. Infantes-Lorenzo JA, Moreno I, Rialde MLÁ, Roy A, Villar M, Romero B, Ibarrola N, de la Fuente J, Puentes E, de Juan L, Gortázar C, Bezós J, Domínguez L, Domínguez M. Proteomic characterisation of bovine and avian purified protein derivatives and identification of specific antigens for serodiagnosis of bovine tuberculosis. *Clin Proteomics.* 2017 Nov 2;14:36. doi: 10.1186/s12014-017-9171-z. PMID: 29142508; PMCID: PMC5669029.
 14. Varela-Castro L, Barral M, Arnal MC, Fernández de Luco D, Gortázar C, Garrido JM, Sevilla IA. Beyond tuberculosis: Diversity and implications of non-tuberculous mycobacteria at the wildlife-livestock interface. *Transbound Emerg Dis.* 2022 Sep;69(5):e2978-e2993. doi: 10.1111/tbed.14649. Epub 2022 Jul 13. PMID: 35780316.
 15. Middleton S, Steinbach S, Coad M, McGill K, Brady C, Duignan A, Wiseman J, Gormley E, Jones GJ, Vordermeier HM. A molecularly defined skin test reagent for the diagnosis of bovine tuberculosis compatible with vaccination against Johne's Disease. *Sci Rep.* 2021 Feb 3;11(1):2929. doi: 10.1038/s41598-021-82434-7. PMID: 33536465; PMCID: PMC7859399.
 16. Scientific Opinion on the use of a gamma interferon test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *EFSA Journal* 2012;10(12):2975 DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2975>
 17. Arrieta-Villegas C, Vidal E, Martín M, Verdés J, Moll X, Espada Y, Singh M, Villarreal-Ramos B, Domingo M, Pérez de Val B. Immunogenicity and Protection against *Mycobacterium caprae* Challenge in Goats Vaccinated with BCG and Revaccinated after One Year. *Vaccines (Basel).* 2020 Dec 10;8(4):751. doi: 10.3390/vaccines8040751. PMID: 33322064; PMCID: PMC7770602.
 18. Roy A, Tomé I, Romero B, Lorente-Leal V, Infantes-Lorenzo JA, Domínguez M, Martín C, Aguiló N, Puentes E, Rodríguez E, de Juan L, Rialde MA, Gortázar C, Domínguez L, Bezós J. Evaluation of the immunogenicity and efficacy of BCG and MTBVAC vaccines using a natural transmission model of tuberculosis. *Vet Res.* 2019 Oct 15;50(1):82. doi: 10.1186/s13567-019-0702-7. PMID: 31615555; PMCID: PMC6792192.
 19. Guétin-Poirier V, Rivière J, Crozet G, Dufour B. Assessment of the cost-effectiveness of alternative bovine tuberculosis surveillance protocols in French cattle farms using the mixed interferon gamma test. *Res Vet Sci.* 2020 Oct;132:546-562. doi: 10.1016/j.rvsc.2020.08.005. Epub 2020 Aug 9. PMID: 32829191.

20. Spohr C, Kaufmann E, Battenfeld S, Duchow K, Cussler K, Balks E, Bastian M. A new lymphocyte proliferation assay for potency determination of bovine tuberculin PPDs. *ALTEX*. 2015;32(3):201-10. doi: 10.14573/altex.1502101. Epub 2015 May 3. PMID: 25935213.
21. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. [Accessed: 4 Nov 2022]. Available at: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/manualdedetecciondeanimalesinfectadosanergicosenexplotacionest2deriesgooconante cedentesdetuberculosis_3_tcm30-479532.pdf
- 22: Sridhara AA, Johnathan-Lee A, Elahi R, Lambotte P, Esfandiari J, Boschioli ML, Kerr TJ, Miller MA, Holder T, Jones G, Vordermeier HM, Marpe BN, Thacker TC, Palmer MV, Waters WR, Lyashchenko KP. Differential detection of IgM and IgG antibodies to chimeric antigens in bovine tuberculosis. *Vet Immunol Immunopathol*. 2022 Oct 4;253:110499. doi: 10.1016/j.vetimm.2022.110499. Epub ahead of print. PMID: 36215871.
23. Infantes-Lorenzo JA, Moreno I, Roy A, Risalde MA, Balseiro A, de Juan L, Romero B, Bezós J, Puentes E, Åkerstedt J, Tessema GT, Gortázar C, Domínguez L, Domínguez M. Specificity of serological test for detection of tuberculosis in cattle, goats, sheep and pigs under different epidemiological situations. *BMC Vet Res*. 2019 Mar 1;15(1):70. doi: 10.1186/s12917-019-1814-z. PMID: 30823881;PMCID: PMC6397464.
24. Zhu X, Zhao Y, Zhang Z, Yan L, Li J, Chen Y, Hu C, Robertson ID, Guo A, Aleri J. Evaluation of an ELISA for the diagnosis of bovine tuberculosis using milk samples from dairy cows in China. *Prev Vet Med*. 2022 Nov;208:105752. doi: 10.1016/j.prevetmed.2022.105752. Epub 2022 Sep 1. PMID: 36075179.
25. Correia CN, McHugo GP, Browne JA, McLoughlin KE, Nalpas NC, Magee DA, Whelan AO, Villarreal-Ramos B, Vordermeier HM, Gormley E, Gordon SV, MacHugh DE. High- resolution transcriptomics of bovine purified protein derivative-stimulated peripheral blood from cattle infected with *Mycobacterium bovis* across an experimental time course. *Tuberculosis (Edinb)*. 2022 Sep;136:102235. doi:10.1016/j.tube.2022.102235. Epub 2022 Jul 30. PMID: 35952489.
26. Beinbauerova M, Slana I. Phage Amplification Assay for Detection of Mycobacterial Infection: A Review. *Microorganisms*. 2021 Jan 23;9(2):237. doi: 10.3390/microorganisms9020237. PMID: 33498792; PMCID: PMC7912421.
27. Xia A, Xu Z, Hu T, Li X, Zhu Z, Chen X, Jiao X. Development of a flow cytometry assay for bovine interleukin-2 and its preliminary application in bovine tuberculosis detection. *Vet Immunol Immunopathol*. 2020 Oct;228:110112. doi: 10.1016/j.vetimm.2020.110112. Epub 2020 Aug 21. PMID: 32892112.
28. Ruiz-Cabello J, Sevilla IA, Olaizola E, Bezós J, Miguel-Coello AB, Muñoz- Mendoza M, Beraza M, Garrido JM, Izquierdo-García JL. Benchtop nuclear magnetic resonance-based metabolomic approach for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Transbound Emerg Dis*. 2022 Jul;69(4):e859-e870. doi: 10.1111/tbed.14365. Epub 2021 Nov 19. PMID: 34717039.
29. Li X, Xia A, Xu Z, Liu J, Fu S, Cao Z, Shen Y, Xie Y, Meng C, Chen X, Jiao X. Development and evaluation of a *Mycobacterium bovis* interferon- γ enzyme-linked immunospot (ELISpot) assay for detection of bovine tuberculosis. *J Dairy Sci*. 2022 Jul;105(7):6021-6029. doi: 10.3168/jds.2021-21301. Epub 2022 May 13. PMID: 35570041.
30. Tincati C, Cappione Iii AJ, Snyder-Cappione JE. Distinguishing Latent from Active *Mycobacterium tuberculosis* Infection Using Elispot Assays: Looking beyond interferon-gamma. *Cells*. 2012 May 7;1(2):89-99. doi: 10.3390/cells1020089. PMID: 24710416; PMCID: PMC3901089.
31. Wang S, Li Y, Shen Y, Wu J, Gao Y, Zhang S, Shao L, Jin J, Zhang Y, Zhang W. Screening and identification of a six-cytokine biosignature for detecting TB infection and discriminating active from latent TB. *J Transl Med*. 2018 Jul 20;16(1):206. doi: 10.1186/s12967-018-1572-x. PMID: 30029650; PMCID: PMC6054748.

Investigação aplicada ao diagnóstico ambiental da tuberculose animal e novos avanços em vigilância genómica

André C. Pereira, Daniela Pinto, Mónica V. Cunha

cE3c – Centre for Ecology, Evolution and Environmental Changes & CHANGE – Global Change and Sustainability Institute, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal; Biosystems & Integrative Sciences Institute (BioISI), Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal

mscunha@fc.ul.pt

Introdução:

A transmissão intraespecífica da tuberculose (TB) animal ocorre por contacto próximo direto com secreções oro-nasais contaminadas (1) ou por ingestão de pastagens, água ou leite contaminados (2). A transmissão interespecífica ocorre sobretudo através de contactos indiretos via fomites ou matrizes ambientais contaminadas com secreções oro-nasais, urina ou fezes (3).

Atualmente, considera-se que a persistência de micobactérias no ambiente desempenha um importante papel na transmissão indireta da TB animal (4). Nomeadamente, a recrudescência de infeção por longos períodos em produções pecuárias após esvaziamento sanitário (5), juntamente com as evidências de um reduzido contato direto entre animais domésticos e animais selvagens (6) que é, no entanto, assíncrono em pastagens, alimentadores e bebedouros que ambos os grupos partilham (7), tornam altamente provável a hipótese de transmissão indireta de *M. bovis* na interface animais domésticos-selvagens. Esta componente de transmissão indireta é altamente dependente da ecologia do hospedeiro, uma vez que animais gregários, com estruturas sociais marcadas, e/ou com determinados comportamentos (como o uso de latrinas, o consumo de carcaças ou hábitos de fossar o solo) apresentam maior risco de infeção (8).

A contaminação ambiental pode ser perpetuada pela persistência de micobactérias viáveis em diversas matrizes, incluindo o solo (9-13), fezes (8), lama (14), feno (12), forragens e pastagens (9). Estudos com amostras experimentalmente infetadas demonstraram que a viabilidade de *M. bovis* é bastante heterogénea dependendo do tipo de matriz e das condições climatéricas, com tempos de sobrevivência em matrizes sólidas de até 6 meses (12, 15) e, em matrizes líquidas, de até 2 meses (12).

Apesar de alguns estudos reportarem a viabilidade de *M. bovis* em matrizes ambientais, estes estudos são sobretudo baseados em amostras experimentalmente infetadas. Esta limitação ocorre por falta de metodologias normalizadas, validadas, com sensibilidade, e facilmente escaláveis que permitam a deteção de células de *M. bovis* viáveis e infecciosas em matrizes ambientais. A cultura continua a ser o método de referência para a deteção de *M. bovis*, mas possui diversas desvantagens, nomeadamente baixa sensibilidade e elevada morosidade (16), sendo particularmente desvantajosa em amostras ambientais, apresentando elevada taxa de insucesso (10) pelos constrangimentos metodológicos da

descontaminação e da tendência de *M. bovis* adotar um estado quiescente no contexto ambiental.

Metodologias que não sejam baseadas em cultura também têm sido adotadas numa tentativa de contornar estas limitações. Uma variedade de técnicas baseadas em amplificação de DNA, como o PCR convencional e o PCR em tempo-real (qPCR) explorando diversas regiões genómicas como alvo (por exemplo, a sequência de inserção IS6110, regiões de diferença ou outros genes taxonomicamente específicos, tais como *mpb64* e *mpb70*) (3, 9, 13), têm sido usadas. As principais limitações destas técnicas são a falta de correlação entre a detecção de DNA de *M. bovis* e a detecção de células viáveis de micobactérias.

Objetivos e Metodologia:

Nenhum método previamente descrito consegue acoplar paralelamente a informação relativa à viabilidade das células de *M. bovis* com a quantificação absoluta dessas mesmas células quando presentes numa matriz ambiental, impossibilitando assim a avaliação do peso da contaminação ambiental na transmissão indireta de *M. bovis*.

O nosso grupo desenvolveu, otimizou e validou uma metodologia modular inovadora que permite detetar, quantificar e separar células viáveis do complexo de *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) presentes em matrizes ambientais. Esta metodologia baseia-se em citometria de fluxo, hibridação fluorescente *in situ* (FISH) e separação de células ativada pela fluorescência (FACS). Primeiramente, um fluoróforo com capacidade de marcar células metabolicamente ativas de MTBC foi selecionado, seguido de um protocolo de FISH para marcar seletivamente as células de MTBC utilizando uma sonda específica para IS6110, juntamente com um sistema de dois anticorpos para amplificação do sinal de fluorescência, e terminando com um processo de recuperação das células de interesse baseado na sua fluorescência. Tudo isto com elevados níveis de pureza e rendimento, permitindo diversas aplicações a jusante, nomeadamente sequenciação total de genomas.

Esta metodologia foi posteriormente aplicada num estudo-piloto numa área com elevada prevalência de tuberculose animal em Portugal, onde *M. bovis* circula num sistema multi-hospedeiro de animais domésticos (bovinos) e animais selvagens (javalis e veados). Nesta área foram amostradas 65 amostras provenientes de 34 localizações em 8 zonas de caça distintas. As amostras correspondem a diversos tipos de matrizes ambientais (sedimentos, lamas e águas).

Resultados:

A metodologia desenvolvida foi validada em amostras experimentalmente infetadas de águas e sedimentos e demonstrou elevada eficiência de recuperação de células de MTBC de ambas as matrizes ambientais (90%), assim como uma elevada linearidade entre os resultados esperados e os resultados observados na avaliação da viabilidade celular de MTBC ($r^2 = 0,93$) e na quantificação de células de MTBC marcadas por FISH ($r^2 \geq 0,96$). O limite de detecção da metodologia foi estabelecido a 10^5 células/g de sedimento no passo de viabilidade celular e a 10^2 células/g de sedimento no passo de marcação taxonómica. O passo de FACS resultou na obtenção de populações celulares com rendimentos de recuperação (50%) e pureza (>60%) bastante satisfatórios.

Esta metodologia apresenta como principais vantagens face às previamente publicadas: a possibilidade de aplicações baseadas em sequenciação total de genomas das células separadas via FACS; e a avaliação da viabilidade celular de MTBC de modo expedito (2 horas vs 3 meses) e detetando células num estado de dormência.

Os resultados do estudo-piloto demonstraram 38% de positividade global para a presença de células de MTBC na amostra original, e apenas 12% de positividade global para a presença de células viáveis de MTBC. Esta positividade aumentou 4,5 X quando as amostras foram sujeitas a um passo de ressuscitação em laboratório, que permitiu a ativação de metabolismo de células previamente quiescentes. Quanto à concentração total de células de MTBC, uma média de $3,4 \times 10^4$ células/g ou /L de amostra foi obtido, sendo a concentração média de células viáveis de MTBC de $8,9 \times 10^3$ células/g ou /L de amostra. As amostras de água tendem a apresentar maior positividade para a presença de MTBC (63%), no entanto a percentagem de células viáveis de MTBC não apresenta diferenças entre os dois tipos de matrizes. Estes resultados permitirão caracterizar o risco espacial ao nível da exploração e da zona de caça e a implementação/melhoria de medidas de biossegurança em áreas com maior risco de contaminação ambiental.

As células resultantes da separação por FACS permitiram uma averiguação preliminar do perfil genómico dos isolados ambientais e a sua comparação com os isolados de campo obtidos nos últimos 20 anos de múltiplos hospedeiros infetados nesta mesma região geográfica.

Conclusão:

A metodologia desenvolvida permite avaliar, quantificar e mapear a viabilidade de *M. bovis* ambiental, impulsionando o avanço do conhecimento nesta área, possibilitando no futuro a avaliação do peso da contaminação ambiental na transmissão indireta de TB animal, com potencial para a reconstrução de redes de transmissão e inferência das vias de excreção de *M. bovis*.

Financiamento:

Trabalho financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) / MCTES através de fundos nacionais (PIDDAC) e pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) da União Europeia, através do Programa Operacional Regional de Lisboa (PORLisboa) e do Programa Operacional Competitividade e Internacionalização para Portugal 2020 (COMPETE) (projeto "Colossus": Control Of tubercuLOSiS at the wildlife/livestock interface using innovative nature-based Solutions, PTDC / CVT-CVT / 29783/2017, LISBOA-01-0145-FEDER-029783, POCI-01-0145-FEDER- 029783).

Agradece-se também à FCT o financiamento estratégico do cE3c e BioISI (UIDB/00329/2020 e UIDB/04046/2020) e a bolsa de doutoramento (SFRH/BD/136557/2018) atribuída a ACP.

Agradece-se a colaboração de proprietários e gestores de caça no Rosmaninhal e Zebreira (PT).

Bibliografia:

1. Menzies FD, Neill SD. Cattle-to-Cattle Transmission of Bovine Tuberculosis. *The Veterinary Journal*. 2000;160(2):92-106.
2. Xu F, Tian L, Li Y, Zhang X, Qi Y, Jing Z, et al. High prevalence of extrapulmonary tuberculosis in dairy farms: Evidence for possible gastrointestinal transmission. *PLOS ONE*. 2021;16(3):e0249341.
3. Santos N, Santos C, Valente T, Gortázar C, Almeida V, Correia-Neves M. Widespread Environmental Contamination with *Mycobacterium tuberculosis* Complex Revealed by a Molecular Detection Protocol. *PLOS ONE*. 2015;10(11):e0142079.

4. Allen AR, Ford T, Skuce RA. Does *Mycobacterium tuberculosis* var. *bovis* Survival in the Environment Confound Bovine Tuberculosis Control and Eradication? A Literature Review. *Veterinary medicine international*. 2021;2021:8812898.
5. Clegg TA, Good M, More SJ. Future risk of bovine tuberculosis recurrence among higher risk herds in Ireland. *Preventive veterinary medicine*. 2015;118(1):71-9.
6. Palmer MV, Waters WR, Whipple DL. Investigation of the transmission of *Mycobacterium bovis* from deer to cattle through indirect contact. *American journal of veterinary research*. 2004;65(11):1483-9.
7. Michel AL, de Klerk L-M, van Pittius NCG, Warren RM, van Helden PD. Bovine tuberculosis in African buffaloes: observations regarding *Mycobacterium bovis* shedding into water and exposure to environmental mycobacteria. *BMC Veterinary Research*. 2007;3(1):23.
8. King HC, Murphy A, James P, Travis E, Porter D, Hung Y-J, et al. The variability and seasonality of the environmental reservoir of *Mycobacterium bovis* shed by wild European badgers. *Scientific Reports*. 2015;5(1):12318.
9. Barbier E, Boschioli ML, Gueneau E, Rochelet M, Payne A, de Cruz K, et al. First molecular detection of *Mycobacterium bovis* in environmental samples from a French region with endemic bovine tuberculosis. *Journal of applied microbiology*. 2016;120(5):1193-207.
10. Barbier E, Rochelet M, Gal L, Boschioli ML, Hartmann A. Impact of temperature and soil type on *Mycobacterium bovis* survival in the environment. *PLoS One*. 2017;12(4):e0176315.
11. Courtenay O, Reilly LA, Sweeney FP, MacDonald DW, Delahay RJ, Wilson GJ, et al. Performance of an environmental test to detect *Mycobacterium bovis* infection in badger social groups. *Veterinary Record*. 2007;161(24):817-8.
12. Palmer MV, Whipple DL. Survival of *Mycobacterium bovis* on feedstuffs commonly used as supplemental feed for white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *J Wildl Dis*. 2006;42(4):853-8.
13. Young JS, Gormley E, Wellington EM. Molecular detection of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium bovis* BCG (Pasteur) in soil. *Appl Environ Microbiol*. 2005;71(4):1946-52.
14. O'Hagan MJ, Matthews DI, Laird C, McDowell SW. Herd-level risk factors for bovine tuberculosis and adoption of related biosecurity measures in Northern Ireland: A case-control study. *Veterinary journal (London, England : 1997)*. 2016;213:26-32.
15. Fine AE, Bolin CA, Gardiner JC, Kaneene JB. A Study of the Persistence of *Mycobacterium bovis* in the Environment under Natural Weather Conditions in Michigan, USA. *Veterinary medicine international*. 2011;2011:765430.
16. Adams AP, Bolin SR, Fine AE, Bolin CA, Kaneene JB. Comparison of PCR versus culture for detection of *Mycobacterium bovis* after experimental inoculation of various matrices held under environmental conditions for extended periods. *Applied and environmental microbiology*. 2013;79(20):6501-6.

Lucha frente a la tuberculosis desde un punto de vista sociológico

Giovanna Ciaravino¹, Josep Espluga², Jordi Casal¹, Alberto Allepuz¹

¹Departament de Sanitat i Anatomia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), España.

²Departament de Sociologia / IGOP - GEPS - ARAG-UAB, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), España.

giovanna.ciaravino@uab.cat

Determinantes psico-sociológicos en sanidad animal: el caso de la tuberculosis

El comportamiento y la toma de decisiones de los seres humanos están influenciados por numerosos factores. Además de los socioeconómicos (p.ej. edad, nivel de educación, sexo, contexto político, consideraciones económicas), estos procesos varían también en función de los riesgos percibidos, y de otros factores individuales (p.ej. personalidad, actitudes, creencias, intenciones, valores, habilidades y conocimientos) y colectivos (normas sociales y dinámicas de grupo, confianza en las instituciones).

La aplicación de programas de control y la implementación de medidas preventivas requiere, en la mayoría de los casos, cambios de comportamiento y de hábitos. Además, para poder alcanzar los objetivos deseados, la adopción de dichas medidas debe mantenerse a lo largo del tiempo. Los cambios de comportamiento son difíciles de inducir y mantener, incluso en situaciones donde las recomendaciones (o normas) están basadas en evidencia, son prácticas, y económicamente asequibles (1-4). El nivel de aceptabilidad de las intervenciones sanitarias y el compromiso de todas las partes interesadas también son factores clave para el éxito de los programas de control y los sistemas de vigilancia (1-2; 5-6). La aceptabilidad de un programa se define como la “*disposición de las personas a participar en ello*”, y está estrictamente relacionada con la intención de las personas de actuar en una determinada manera (7).

En salud pública, los determinantes sociales y psicosociológicos han sido ampliamente estudiados para comprender el comportamiento hacia la prevención y el control de enfermedades infecciosas. Ya en los años 70 y 80 la Organización Mundial de la Salud promovía la investigación de las relaciones existentes entre la salud y el comportamiento de individuos y poblaciones, proponiendo utilizar encuestas sobre conocimientos, actitudes, creencias y prácticas (CACP) como herramienta para mejorar las estrategias de prevención de enfermedades infecciosas (4, 8). En este contexto, la investigación de los determinantes sociales y psicológicos, además de las variables relacionadas con los comportamientos de riesgo o prevención, pretende analizar los procesos que subyacen a dichos comportamientos y las interacciones entre las distintas variables (4, 8-9). Sin embargo, en sanidad animal la aplicación de metodologías propias de las ciencias sociales es bastante más reciente (1-2, 4, 10-15).

Desde una perspectiva de sanidad animal, el conocimiento de los factores determinantes, el comportamiento y la toma de decisiones de ganaderos y veterinarios puede facilitar la adopción de las medidas de control y de bioseguridad y maximizar el efecto de las políticas e intervenciones sanitarias (2, 4, 15). Además, las actitudes, creencias y opiniones pueden tener un fuerte impacto en la aceptación de los programas sanitarios y son un punto clave que deben considerarse al diseñar las estrategias de prevención y control de las enfermedades (2, 4, 7, 11, 15). El nivel de compromiso de ganaderos, veterinarios, y administración puede ayudar a crear interés, responsabilidad y una norma social. Sin embargo, garantizar el compromiso requiere proporcionar apoyo y asesoramiento, y conocer los diferentes aspectos que puedan determinar críticamente su nivel, tales como son las redes sociales de los ganaderos, las fuentes de asesoramiento, la relación entre ganaderos y asesores y la confianza entre ellos. El compromiso, además, puede generar “el ejemplo” (ejemplificación), influyendo en factores, como las opiniones de los demás y las normas sociales de la comunidad, y por lo tanto puede determinar cambios de comportamiento (5). Finalmente, el conocimiento de lo que motiva o inhibe el comportamiento de ganaderos y veterinarios hacia la implementación de medidas de prevención y el control de las enfermedades animales es también necesario para garantizar una comunicación del riesgo eficaz (4).

Entre los diferentes marcos teóricos propuestos para el estudio de las conductas de las personas, la Teoría del Comportamiento Planificado (del inglés: *Theory of Planned Behavior* (TPB)) (16) ha sido el más utilizado en sanidad animal para estudiar los factores que afectan el comportamiento y la toma de decisiones de ganaderos y veterinarios (10, 12). El modelo ilustra cómo el comportamiento está determinado por la intención de cambiar, que a su vez está influenciada por tres componentes principales: (i) las **creencias conductuales** que determinan la **actitud**, que a menudo se basan en valores fundamentales personales, incluida la percepción del riesgo y/o resultado. Las actitudes pueden verse influenciadas también por las experiencias previas o por los valores propios; (ii) Las **creencias normativas**, que están determinadas por la percepción de las **normas sociales**. Las normas sociales se derivan de las expectativas percibidas de los contactos sociales cercanos, como la familia, la comunidad local, los colaboradores y quizás los socios de la industria. La presión de grupo influye en la creencia normativa de una persona; y (iii) La **creencia en la autoeficacia** (sobre el control) que es la percepción de la capacidad de llevar a cabo el cambio de comportamiento para obtener el resultado deseado y está estrechamente asociado con la confianza en sí mismo de una persona (4, 10-12, 15).

Una segunda teoría ampliamente utilizada es el Modelo de Creencias de Salud (del inglés: *Health Belief Model* (HBM)) (17), que sostiene que las decisiones de las personas sobre si actuar o no dependen de: (i) la susceptibilidad percibida al riesgo, (ii) la gravedad percibida del riesgo, (iii) los beneficios y las barreras percibidas, (iv) la exposición a señales que incitan a la acción y (v) la confianza en la propia capacidad para realizar con éxito una acción (autoeficacia) (10, 15). Finalmente, otros modelos, como los Modelo Social Ecológico que se centran en múltiples niveles de influencia, incluyendo variables sociales y ambientales; es decir, políticas, individuales, interpersonales, organizacionales, comunitarias y públicas. Dichos modelos consideran que los comportamientos afectan y son influenciados por el entorno social (3, 10-11, 18).

En el caso de la tuberculosis animal, se ha evidenciado que la comunicación, el contexto social, el nivel riesgo percibido y otros aspectos psicosociológicos tienen un impacto en la transmisión, la detección y el control de la enfermedad, y por lo tanto en la correcta implementación de los programas de erradicación (1-2, 14). En 2014, la importancia de tener en cuenta dichos factores fue reconocida también por la Autoridad

Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) que propuso un marco conceptual para guiar la identificación de los principales factores biológicos y no biológicos que influyen en la infección, detección y control de la TB, identificando como “partes interesadas” en la implementación de las estrategias de control referentes políticos (gubernamentales y no), público en general (incluyendo los consumidores), veterinarios, ganaderos, legisladores y gestores del riesgo (19). Se resumen a continuación los principales factores no biológico que han sido descrito como potenciales obstáculos a la aceptación y, por lo tanto, al éxito de los programas de erradicación de la bTB:

- Falta de confianza en la ciencia y/o en las instituciones: Dudas y desconfianza hacia los resultados de las pruebas de diagnóstico en vivo, que genera una sensación de impotencia y frustración (7, 13, 20-25). Falta de confianza en el asesoramiento y falta de motivación a seguir los referentes y las recomendaciones (20).
- Experiencias previas y creencias conductuales: haber tenido un brote o animales reaccionantes a la prueba en piel puede dar lugar a cambios en el riesgo percibido y/o en ciertas creencias conductuales con relación a las pruebas de diagnóstico o la eficacia de las medidas de control (11, 20,23). Además, para muchos ganaderos, la tuberculosis bovina no es una enfermedad prioritaria, es solo una de las tantas preocupaciones a que se enfrentan a diario los ganaderos (24-25). Finalmente, se minimiza el riesgo zoonótico de la enfermedad que se considera un evento muy raro (26).
- Elevados Costes del control y pocos beneficios: los ganaderos muestran resistencia a la implementación de las medidas de control percibida inviables en términos de mano de obra y costes, o porque los beneficios obtenidos no justifican los costes asociados a su implementación (22-23). Además, aunque los ganaderos encuentran importante el control de la tuberculosis bovina, ven al gobierno como financieramente responsable del control de enfermedades, y esto puede dar lugar a conflictos entre el sector y los servicios veterinarios oficiales sobre la distribución de responsabilidad del control de la enfermedad (23).
- Relaciones sociales: descontento de los veterinarios privados (por stress, falta de apoyo y baja compensación) e inadecuada comunicación entre veterinarios privados y servicios veterinarios oficiales (7).

Percepción y comunicación del riesgo

A menudo la evaluación de los riesgos por parte de expertos y gestores del riesgo no coincide con la evaluación de la población general. Los expertos basan sus evaluaciones en las evidencias científicas, en el concepto de “riesgo aceptable” y en los resultados de los procesos de análisis del riesgo (18). La evaluación de la gente común es intuitiva, tiende a mantenerse igual a pesar de la existencia de nueva información, está centrada en la seguridad total (“*riesgo zero*”) y pone el énfasis en las consecuencias personales, lo que genera discrepancia entre opiniones (18, 27). Estas diferencias suelen reflejarse también en el lenguaje científico y estadístico de los especialistas y el lenguaje intuitivo del público. Una buena comunicación procura “traducir” estos lenguajes para lograr la comprensión y cooperación entre todas las partes.

El sesgo entre la realidad (evidencias científicas) y la percepción individual se atribuyen a la existencia del llamado “filtro de percepción”. La percepción del riesgo es la evaluación y el juicio que las personas hacen sobre las características y la gravedad de los riesgos, y el riesgo percibido es el resultado de dicha valoración (18, 28).

Por lo tanto, la percepción del riesgo es inherentemente subjetiva, trata de opiniones y, además de los factores considerados en el análisis del riesgo, está determinada por

múltiples factores afectivos (emociones, sentimientos, estados de ánimo, etc.), cognitivos (gravedad de los eventos, medidas de mitigación de riesgos, , etc.), contextuales (encuadre de la información de riesgo, cobertura de los medios, disponibilidad de fuentes alternativas de información, etc.) e individuales (rasgos de personalidad, experiencia previa, edad, etc.). Para proporcionar una imagen completa de los factores que influyen en la percepción del riesgo se han desarrollado varios modelos, entre ellos en un documento de la EFSA, publicado en el 2021(18), se describen un modelo llamado el '*Diagrama de influencia anidado para la percepción del riesgo*' (18). Este modelo agrupa los factores (tanto individuales como colectivos, innatos como aprendidos) en distintos niveles que interactúan entre ellos para finalmente conformar cómo las personas perciben riesgo (figura 1). A su vez, el riesgo percibido influye en el comportamiento. Las percepciones del riesgo están relacionadas con las actitudes, las creencias en la autoeficacia y las normas subjetivas de las personas. Además, influyen en la percepción de vulnerabilidad al riesgo (susceptibilidad percibida) y en la gravedad percibida (18).

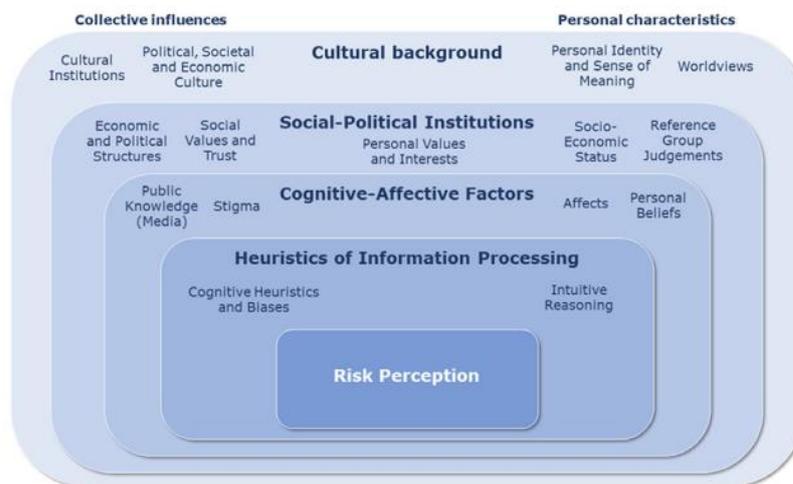


Figura 1: 'Diagrama de influencia anidado para la percepción del riesgo' (del inglés: "*The Nested Influence Diagram for Risk Perception*"). Source: (18)

La comunicación de los riesgos tiene como objetivo promover la toma de decisiones informada, los cambios positivos en el comportamiento y el mantenimiento de la confianza. Una comunicación regular contribuye a garantizar que el público esté informado de la naturaleza y del nivel de riesgo, y de cuáles son los cambios de comportamiento deseables que pueden reducirlo al mínimo (18). El nivel de información sobre un riesgo es un factor básico en la modulación de la percepción social del riesgo. Sin embargo, incluso cuando se cuenta con buena información, es decir cuando el riesgo es bien "conocido", el grado de confianza atribuido a la fuente de esa información puede influir en cómo se percibe el riesgo (27). Para que la comunicación sea eficaz se debe utilizar un lenguaje simple y común a todas las partes interesadas, tener en cuenta las distintas necesidades de información, el contexto sociopolítico y todos los factores (individuales y de grupo) que determinan las percepciones de riesgo (18, 27).

La predisposición de los ganaderos a adoptar cambios con respecto a las prácticas de manejo, y las actitudes de ganaderos y veterinarios hacia implementación de medidas de control y de bioseguridad, están influenciadas por el riesgo percibido. Por lo tanto, comprender cómo ganaderos y veterinarios perciben los riesgos resulta fundamental para conseguir una comunicación eficaz y aumentar la probabilidad de una correcta aplicación de las medidas de prevención y control, especialmente de aquellas que requieren cambios de comportamiento.

Factores sociológicos y comunicación sobre la tuberculosis animal en España

En España, estudios llevados a cabo en Andalucía, Cataluña, Comunidad Valenciana y Galicia con ganaderos y veterinarios han evidenciado la presencia de distintos grupos de opiniones y actitudes hacia la enfermedad y su programa de erradicación (29-31). Dichas diferencias resultan más evidentes entre los ganaderos; sin embargo, las opiniones de los veterinarios presentan también cierta variabilidad. Los temas que más división generan están relacionados con las percepciones sobre ocurrencia y gravedad de la enfermedad, fiabilidad de las pruebas de diagnóstico en vivo, y las posibilidades de éxito del programa de erradicación de tuberculosis en presencia de reservorios silvestres (30). Además, entre los distintos grupos de opiniones existen pocos temas de consenso; la necesidad de erradicar la tuberculosis para evitar las restricciones comerciales y mejorar la comunicación entre ganaderos y veterinarios son los únicos dos temas que generan consenso (31).

Los principales factores psico-sociológicos identificados pueden resumirse de la siguiente manera:

1. *Creencias conductuales y Percepción del riesgo (Actitudes)*

Principalmente entre ganaderos, la falta de lesiones en animales reaccionantes hace que se perciba como poco probable la presencia de la enfermedad, contribuyendo a aumentar desconfianza en las pruebas de diagnóstico en vivo. En algunos casos, estas opiniones derivan de un escaso nivel de conocimiento sobre el patógeno y su epidemiología. En general, se ha observado una baja percepción del riesgo zoonóticos, ya que, debido a la pasteurización de la leche y la vigilancia intensiva en las granjas, la transmisión a las personas no es percibida como un riesgo significativo para la salud pública. Esta percepción resulta reforzada por la falta de controles sanitarios en personas en contacto con animales reaccionantes.

2. *Percepción de control*

Muchos ganaderos perciben el saneamiento como una “lotería”, es decir, una situación sobre la que no puede actuar ni pueden controlar. En general, la falta de confianza en las pruebas diagnósticas, la percepción de que la ocurrencia de la enfermedad dependa principalmente de “fuentes externas” (p.ej. los reservorios silvestres), y la percepción de falta de medidas de bioseguridad de demostrada eficacia, han generado un sentimiento de impotencia y vulnerabilidad (especialmente entre ganaderos, pero también veterinarios). La percibida falta de opciones de control parece contribuir a una actitud negativa hacia el programa de erradicación (“nunca se erradicará la enfermedad”) y a la falta de confianza en los servicios veterinarios oficiales.

3. *Aceptabilidad del programa*

Existe cierta falta de motivación hacia el programa de erradicación: se cumple por imposición de ley, no porque se considere prioritario erradicar la enfermedad ya que no se perciben claros beneficios de estar libres. Más bien se perciben los costes debidos control de la enfermedad, sobre todo en caso de restricciones de movimientos, sacrificios de animales o aplicación de medidas de bioseguridad. En este contexto, la percepción de una distribución desigual de los costes también podría contribuir al descontento de los ganaderos, que identifican a las instituciones (servicios veterinarios oficiales) como responsables (económicamente) del control de enfermedades, especialmente aquellas con impacto en la salud pública.

4. *Nivel de compromiso y relaciones sociales*

Los veterinarios privados tienen un papel importante en la influencia de la opinión de los ganaderos. Sin embargo, no siempre este colectivo se siente suficientemente apoyado por parte de los servicios veterinarios, a los que piden un rol de asesoramiento más que de inspección. Además, a menudo los veterinarios de saneamiento sufren mucha presión en la ejecución de las pruebas de campo (IDT) y, tanto ellos como los veterinarios comarcales, reclaman más formación en tema de comunicación hacia los ganaderos. Por su parte los

ganaderos reclaman más claridad en los protocolos de vigilancia y control y, a menudo, los resultados de las pruebas de saneamiento y las medidas de control aplicadas no se comprenden. Además, evidencian falta de lugares de encuentro para intercambiar información y expresar dudas e inquietudes sobre la enfermedad y piden más asesoramiento en la implementación de las medidas recomendadas (especialmente con respecto a bioseguridad y fauna). Dichos aspectos pueden haber contribuido a generar cierta desconfianza hacia los servicios veterinarios oficiales y pueden tener influencia en la motivación y el nivel de compromiso con el programa de ganaderos y veterinarios privados.

En general, el programa de erradicación se desarrolla en un contexto social marcado por una gran desconfianza entre los diversos actores, que dificulta una valoración compartida del riesgo con respecto a la tuberculosis animal y de la idoneidad del programa de control. Se trata de una situación en la que las dimensiones socioculturales y político-institucionales del riesgo prevalecen sobre las dimensiones económicas y de salud. A la luz de estos resultados, mejorar el nivel de información sobre las medidas de prevención y control, las dinámicas de comunicación y la confianza entre las partes interesadas aparece fundamental para poder aumentar la aceptabilidad del Programa de erradicación de la tuberculosis bovina en España. El desarrollo de una eficaz estrategia de comunicación puede contribuir a aumentar la motivación de ganaderos y veterinarios, evitar actitudes fatalistas hacia al control de enfermedad y crear una visión común del riesgo asociado a la tuberculosis animal.

Por todo ello, en el marco del proyecto INNOTUB (<https://innotub.eu/>), ha sido realizado un estudio en la región transpirenaica (Cataluña y Pirineos Atlánticos) con el objetivo de caracterizar la comunicación sobre bTB entre ganaderos y veterinarios y desarrollar recomendaciones para mejorar las estrategias existentes (32). Dicho estudio se ha llevado a cabo en colaboración con sociólogos y especialistas de la comunicación. En cada área, se realizaron entrevistas en profundidad a ganaderos y veterinarios para recopilar información en relación a la comunicación sobre la tuberculosis bovina. Las entrevistas fueron analizadas con un enfoque temático cualitativo basado en un método comparativo iterativo. Además, para investigar los procesos de comunicación (fuentes, actores, canales, temas y su interpretación) se realizó un análisis de prensa sobre una muestra de 153 (España) y 66 (Francia) textos disponibles en línea (notas de prensa y otro material de comunicación). La palabra clave utilizada fue "tuberculosis bovina", los criterios de selección incluyeron año de publicación (2018-2020), área geográfica (nivel nacional o regional) y diversidad de fuentes, y los textos se analizaron utilizando el Análisis de contenido y el Análisis metafórico crítico. Finalmente, se utilizó un enfoque inspirado en la metodología *Surface Training Advanced Virtual Environment* (STAVE) para identificar temas prioritarios y desarrollar una lista de propuestas para mejorar la comunicación. El proceso incluyó tres grupos focales de discusión y una reunión con representantes de los servicios veterinarios regionales. Finalmente, se organizó un taller deliberativo para promover la creación de redes/comités territoriales de prevención y control de la TB en el que participaron todas las partes interesadas (figura 2).



Figura 2. Representación esquemática del diseño del estudio llevado a cabo en el marco del proyecto INNOTUB

Los resultados obtenidos en España evidencian una comprensión heterogénea sobre la tuberculosis bovina entre las partes interesadas y confirman la existencia de un debate controvertido sobre bTB en el que cada colectivo defiende posiciones diferentes. Esto se refleja en la diferencia de temáticas comunicadas. La comunicación institucional y científica se centra casi exclusivamente en la detección y control de la enfermedad, dejando en un segundo plano otros aspectos sociales y económicos, mientras que los ganaderos extienden su comunicación a una mayor variedad de temas (figura 3). Con respecto a esto se recomienda ampliar los aspectos sobre los que se debate, e introducir temáticas que afectan y/o preocupan de manera directa a ganaderos, como por ejemplo riesgos y beneficios, aspectos económicos y sociales y temas de formación. Emerge la necesidad de buscar marcos metafóricos comunes. El enfoque metafórico difiere mucho entre los distintos actores: la administración y los científicos emplean metáforas de lucha y avances, sin embargo, los ganaderos y veterinarios se sitúan en un marco de estancamiento y de sacrificio, jugando un papel pasivo. Compartir marcos supone asumir una misma visión de la cuestión (utilizar mismas metáforas). Resulta también importante empoderar a los ganaderos a través de la comunicación: visibilizarlos como actores fundamentales, darles voz, convertirlos en sujetos activos de las medidas.

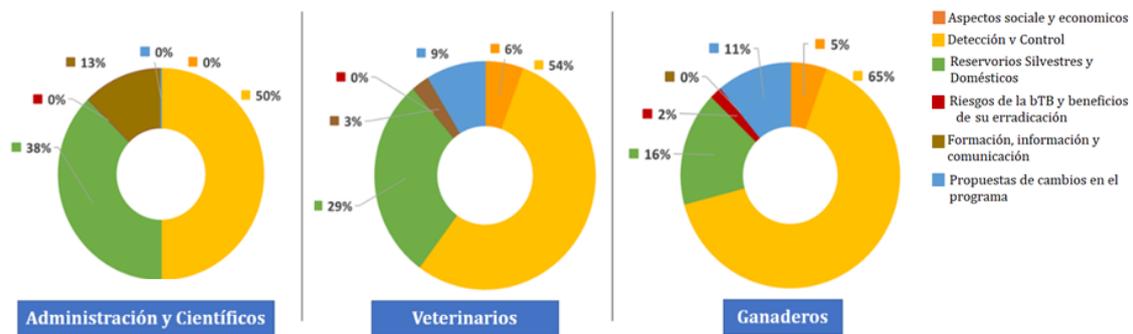


Figura 3: Resultados del análisis de prensa realizado sobre una muestra de 153 textos disponibles en línea año de publicación (2018-2020).

Las principales propuestas desarrolladas por ganaderos y veterinarios para mejorar la comunicación actual sobre la TB incluyen: (i) Crear espacios comunicativos y participativos para mejorar el intercambio de información, hacer reflexiones conjuntas y contribuir a la búsqueda de soluciones; (ii) Desarrollar protocolos claros y escritos que puedan adaptarse a casos específicos, aumentando la participación de todas las partes interesadas en el diseño de protocolos; (iii) Mejorar la accesibilidad de la información (actualización de webs, bases de datos compartidas, etc.) y elaborar información visual (infografías, vídeos cortos, fichas, etc); (iv) Rediseñar los cursos formativos para poder compartir experiencias y conocimientos de campo, incluyendo también contenidos relacionados con aspectos sociales y económicos, y proporcionar herramienta que faciliten la comunicación con los ganaderos; (v) Dar más valor al trabajo realizado tanto por los veterinarios como por los ganaderos y realizar acciones de pedagogía entre la población en general para poner en valor las funciones y aportaciones del sector ganadero a la sociedad; (vi) Establecer un 'Comité de Crisis' local con representantes de los ganaderos, de los veterinarios y de la administración que pudiera apoyar la toma de decisiones sobre casos específicos.

Las actividades participativas llevadas a cabo con estos colectivos plantearon una serie de mejoras en la comunicación acerca de la tuberculosis. Sin embargo, para que esto sea posible, tanto el sector ganadero como los veterinarios privados deberían ser capaces de organizarse, realizar un debate interno e identificar y priorizar necesidades y obstáculos que dificultan el trabajo cotidiano y, a partir de aquí, plantear una serie de reuniones con la Administración para abordar su posible resolución. Es necesarios que los grupos de defensa

y protección Sanitaria Ganaderas (ADSG) asuman un papel activo y de liderazgo para impulsar la creación de dichos espacios, actuando de “intermediarios” entre el sector ganadero y los Servicios veterinarios oficiales. También se considera que el sector ganadero debería saber identificar y expresar mejor sus inquietudes, para que la Administración pueda darles respuestas más específicas. Esto requeriría de una articulación más eficaz del sector. Como se ha dicho más arriba, las ADSG podrían ser piezas clave en esta articulación, pero antes habría que realizar un trabajo divulgativo, pedagógico y de dinamización para que sus miembros se sintieran más implicados y, de esta manera, estar mejor preparados para participar en los procesos de toma de decisiones.

Bibliografía:

1. Moda, G. (2006). Non-technical constraints to eradication: the Italian experience. *Vet Microbiol*, 112(2–4), 253–8. doi:10.1016/j.vetmic.2005.11.021
2. Pfeiffer, D.U. (2006). Communicating risk and uncertainty in relation to development and implementation of disease control policies. *Vet Microbiol* 112(2–4):259–64. doi:10.1016/j.vetmic.2005.11.020
3. Panter-Brick, C., Clarke, S.E., Lomas, H., Pinder, M., Lindsay, S.W., (2006). Culturally compelling strategies for behaviour change: a social ecology model and case study in malaria prevention. *Soc. Sci. Med.* 62, 2810–2825. doi: 10.1016/j.socscimed.2005.10.009
4. Ellis-Iversen, J., Cook, A.J., Watson, E., Nielen, M., Larkin, L., Wooldridge, M., & Hogeveen, H. (2010). Perceptions, circumstances and motivators that influence implementation of zoonotic control programs on cattle farms. *Preventive veterinary medicine*, 93(4), 276-285. doi: 10.1016/j.prevetmed.2009.11.005
5. Pike, T., (2008). Understanding Behaviours in a Farming Context. Defra Agricultural Change and Environment Observatory Discussion Paper.
6. German, R.R., Lee, L.M., Horan, J., Milstein, R., Pertowski, C., & Waller, M. (2001). Updated guidelines for evaluating public health surveillance systems. Center for Disease Control and Prevention (CDC), *MMWR Recomm Rep*, 50(1-35).
7. Calba, C., Goutard, F.L., Vanholme, L., Antoine-Moussiaux, N., Hendrikx, P., Saegerman, C. (2016). The added-value of using participatory approaches to assess the acceptability of surveillance systems: the case of Bovine tuberculosis in Belgium. *PLoS One* 11(7):e0159041. doi:10.1371/journal.pone.0159041
8. Simón, M. (1993). *Psicología de la salud; aplicaciones clínicas y estrategias de intervención*. Madrid: Pirámide.
9. Berkman, L., Kawachi, I. (2000). A historical framework for social epidemiology. In: Berkman LF, Kawachi I, editors. *Social Epidemiology*. New York: Oxford University Press, p. 3–12.
10. Biesheuvel, M. M., Santman-Berends, I. M., Barkema, H. W., Ritter, C., Berezowski, J., Guelbenzu, M., & Kaler, J. (2021). Understanding farmers' behavior and their decision-making process in the context of cattle diseases: A review of theories and approaches. *Frontiers in veterinary science*, 8.
11. Hidano, A., Enticott, G., Christley, R.M., Gates, M.C. (2018). Modeling dynamic human behavioral changes in animal disease models: challenges and opportunities for addressing bias. *Front Vet Sci*, 5, 137. doi: 10.3389/fvets.2018.00137
12. Brennan, M.L., Wright, N., Wapenaar, W., Jarratt, S., Hobson-west, P., Richens, I.F., et al. (2016). Implementing Cattle Disease Prevention and Control Great Britain. *Animals* 6(10), 61. doi:10.3390/ani6100061.
13. Enticott, G., Maye, D., Carmody, P., Naylor, R., Ward, K., Hinchliffe, S., et al. (2015). Farming on the edge: farmer attitudes to bovine tuberculosis in newly endemic areas. *Vet Rec* 177, 439–439. doi:10.1136/vr.103187.
14. Pfeiffer, D.U. (2013). Epidemiology caught in the causal web of bovine tuberculosis. *Transbound Emerg Dis* 60:104–10. doi:10.1111/tbed.12105
15. Ritter, C., Jansen, J., Roche, S., Kelton, D.F., Adams, C.L., Orsel, K., et al. (2017). Invited review: Determinants of farmers' adoption of management-based strategies for infectious disease prevention and control. *J Dairy Sci*, 100, 3329–47. doi: 10.3168/jds.2016-11977

16. Azjen, I., 1985. From intentions to actions: a theory of planned behaviour. In: Kuhl, J., Beckman, J. (Eds.), *Action-control: From Cognition to Behaviour*. Springer, Heidelberg.
17. Rosenstock, I.M., 1974. Historical origins of the health belief model. *Health Education Monographs*, 2, 328–335.
18. EFSA (European Food Safety Authority), Maxim, L., Mazzocchi, M., Van den Broucke, S., Zollo, F., Robinson, T., Rogers, C., Vrbos, D., Zamariola, G. and Smith, A. (2021). Scientific report on technical assistance in the field of risk communication. *EFSA Journal* 2021, 19(4), 6574, 113 pp. doi:10.2903/j.efsa.2021.6574
19. EFSA (European Food Safety Authority)- Panel on Animal Health and Welfare (AHAW). (2014). Statement on a conceptual framework for bovine tuberculosis. *EFSA Journal*, 12(5). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3711>.
20. Broughan, J.M., Maye, D., Carmody, P., Brunton, L.A., Ashton, A., Wint, W., et al. (2016). Farm characteristics and farmer perceptions associated with bovine tuberculosis incidents in areas of emerging endemic spread. *Prev Vet Med* 129:88–98. doi:10.1016/j.prevetmed.2016.05.007
21. Enticott, G. (2008). The ecological paradox: social and natural consequences of the geographies of animal health promotion. *Trans Inst Br Geogr.* 33:433–46. doi: 10.1111/j.1475-5661.2008.00321.x
22. Christley, R.M., Robinson, S.E., Moore, B., Setzkorn, C., Donald, I. (2011). Responses of farmers to introduction in England and Wales of pre-movement testing for bovine tuberculosis. *Prev Vet Med.* 100:126–33. doi: 10.1016/j.prevetmed.2011.02.005
23. O'Hagan, M.J.H., Matthews DI, Laird C, Mcdowell SWJ. (2016). Farmers' beliefs about bovine tuberculosis control in Northern Ireland. *Vet J* 212:22–6. doi:10.1016/j.tvjl.2015.10.038
24. Robinson, P. (2017). Farmers A and bovine tuberculosis: Contextualising statutory disease control within everyday farming lives. *J Rural Stud.*, 55, 168–80. doi:10.1016/j.jrurstud.2017.08.009
25. Clarke, A., Byrne, A.W., Maher, J., Ryan, E., Farrell, F., McSweeney, C. & Barrett, D. (2022). Engaging With Farmers to Explore Correlates of Bovine Tuberculosis Risk in an Internationally Important Heritage Landscape: The Burren, in the West of Ireland. *Front. Vet. Sci.* 9:791661. doi: 10.3389/fvets.2022.791661
26. Robinson, P. A. (2019). Farmer and veterinarian attitudes towards the risk of zoonotic *Mycobacterium bovis* infection in Northern Ireland. *Veterinary Record*, 185(11), 344–344. doi:10.1136/vetrec-2019-105389
27. Powell, D. y Leiss, W. (1997). *Mad Cows and Mother's Milk: the perils of poor risk communication*. McGill–Queen's University Press, Montreal
28. Slovic, P., (1993). Perceived risk, trust, and democracy. *Risk Anal.* 13 (6), 675–682.
29. Ciaravino, G., Ibarra, P., Casal, E., Lopez, S., Espluga, J., Casal, J., Napp, S., Allepuz, A. (2017) Farmer and Veterinarian Attitudes towards the Bovine Tuberculosis Eradication Programme in Spain: What Is Going on in the Field? *Front Vet Sci.* Nov 27;4:202. doi: 10.3389/fvets.2017.00202.
30. Ciaravino, G., Espluga, J., Casal, J., Pacios, A., Mercader, I., & Allepuz, A. (2020). Profiles of opinions among farmers and veterinarians towards the Tuberculosis Eradication Programme in cattle in Spain. *Preventive veterinary medicine*, 176, 104941. doi:10.1016/j.prevetmed.2020.104941
31. Ciaravino G. et al., (2022). La metodología Q aplicada al estudio de las opiniones acerca de la tuberculosis animal y su control. Artículo en preparación.
32. Ciaravino, G., Moragas, C.M., Capdevila, A., Freixa, V., López, F., Espluga, J., Vergne, T., Allepuz A. (2021). Dynamics and perceptions on the communication about bovine tuberculosis in Spain and France. Presentado en SVEPM conference, 24-26 marzo de 2021, Toulouse, France. Artículo en preparación.

Una revisión sobre la priorización de enfermedades infecciosas en el contexto Una Única Salud: ¿qué tal la tuberculosis?

Joaquín Vicente Baños

¹Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC), Universidad de Castilla-La Mancha (UCLM)

Joaquin.vicente@uclm.es

Resumen: La Comisión Europea ha asignado recursos específicos a los Estados miembros para establecer un sistema de vigilancia coordinado en el marco de un enfoque Una Única Salud (One health) para patógenos transfronterizos que suponen un riesgo para la Unión. La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha realizado un ejercicio de priorización de los patógenos zoonóticos hacia los que se debe dirigir la vigilancia, y cada estado miembro solicitará fondos para ello. Una revisión de los programas de vigilancia sanitaria de enfermedades zoonosis emergentes transfronterizas en Europa ha evidenciado que estos están altamente atomizados y poco armonizados en cuanto a sus características, así como los hospedadores y patógenos que abordan. Si bien la tuberculosis animal no será objeto de nueva co-financiación por la Comisión (al ya estarlo, de momento), esta supone un perfecto ejemplo de enfoque OH del cual se puede beneficiar el próximo sistema europeo coordinado de vigilancia de zoonosis. Se requiere para ello que diferentes los sectores (salud animal, humana y ambiental) consideren conjuntamente sistemas de múltiples patógenos, múltiples huéspedes y el ambiente mediante una aproximación transversal. Es fundamental involucrar a los profesionales de enfermedades de la fauna silvestre para la vigilancia pasiva de los principales reservorios de hospedantes, y los del medio ambiente para la vigilancia activa. En una revisión de ejercicios de priorización de los patógenos en función de objetivos, criterios y contextos muy variables, se ha podido determinar que la tuberculosis animal en nuestro contexto europeo habitualmente se considera entre el 20% de patógenos más relevantes, particularmente cuando se evalúa junto a otros patógenos zoonóticos o animales. Podemos concluir que la utilidad de estos rankings está condicionada por los objetivos y motivaciones con que se plantean, y estos ejercicios de priorización han de ser interpretados cuidadosamente para ser útiles en las futuras políticas vigilancia sanitaria, pero flexibles para adecuarse a una aproximación OH real. No hay muchos rankings, si bien son valiosos, ya que cada uno de ellos requiere gran esfuerzo y logística. Se ha podido constatar que, según los objetivos del ejercicio concreto de priorización, el CMTB ha sido incluido en la lista de patógenos previa casi sin excepción cuando así se requería. Es llamativo que estos rankings tienden a realizarse asociados a la existencia de crisis sanitarias, algunas de carácter global, lo que influye en la importancia relativa que se otorga a diferentes patógenos. Así, el CMTB en nuestro ámbito europeo adquirió su mayor relevancia relativa en estos ejercicios de priorización en el entorno de 2000, en una década en la que afloraron numerosos trabajos científicos en Europa, revelando la importancia de los hospedadores silvestres para el mantenimiento y transmisión del CMTB al ganado. Una reflexión final es que los rankings para patógenos, considerados estos de manera individual, pierden parte de su sentido como herramienta para decidir políticas de vigilancia sanitaria cuando la aproximación es OH. En este caso, gana en importancia la definición de una “matriz de hospedadores/patógenos/ambiente”

ideal (sistema multi-patógeno multi-hospedador) sobre la que se puede diagnosticar de manera transversal.

Introducción

El consorcio *ENETWILD* (www.enetwild.com) ha desarrollado un proyecto financiado por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) EFSA, cuyo objetivo principal es la armonización y recopilación de información sobre la distribución geográfica y la abundancia de la fauna silvestre y sus patógenos en toda Europa. La Comisión Europea (UE) ha asignado recursos específicos para los estados miembros de la UE (MS) para establecer un sistema de vigilancia coordinado bajo el enfoque de una Única Salud (One Health, OH) para patógenos transfronterizos que amenazan a la Unión. La UE ha solicitado a EFSA que realice una evaluación de riesgos para priorizar los patógenos a los que debe dirigirse tal vigilancia. En este contexto, las tareas solicitadas por la EFSA a *ENETWILD* son identificar, describir y tomar nota de las lecciones aprendidas de los programas de vigilancia sanitaria coordinada/colaborativa ya existentes; y dar soporte a la toma de decisiones sobre la priorización de patógenos a los que se debe dirigir la vigilancia; proporcionando recomendaciones para una vigilancia sostenible de patógenos zoonóticos en animales y el medio ambiente.

Se realizaron búsquedas en varias bases de datos de literatura biomédica y científica y se seleccionaron utilizando criterios de inclusión/exclusión para filtrar referencias que presentaban criterios de priorización, herramientas o métodos aplicables a patógenos transmisibles y zoonóticas. De estas, se seleccionaron aquellas referencias en las cuales se realizó el ejercicio completo de priorización, y se presentó un ranking de patógenos según la importancia otorgada. Si bien la tuberculosis animal no será objeto de nueva cofinanciación por la Comisión (al ya estarlo, de momento), esta supone un perfecto ejemplo de enfoque OH del cual se puede beneficiar el próximo sistema europeo coordinado de vigilancia de zoonosis. En esta presentación se analiza el posicionamiento de la tuberculosis animal en estos rankings y se discute la importancia otorgada desde diferentes perspectivas.

Búsqueda bibliográfica

Nuestra aproximación pretende localizar artículos/documentos académicos revisados por pares que describieran metodologías de clasificación de riesgo para enfermedades en:

- Bases de datos biomédicas (Medline, Embase)
- Bases de datos científicas (ISI Web of Science, Scopus)

La cadena de búsqueda utilizada fue:

(surveillance OR monitor*) AND (disease* OR pathogen) AND (prioritization OR prioritisation)

Los resultados se filtraron por año (incluido el año 2000 en adelante) y se eliminaron los duplicados. Además de las referencias recuperadas directamente de los navegadores científicos, se ha examinado la literatura citada para identificar las referencias faltantes y la literatura gris/técnica (literatura/informes institucionales).

Los criterios de inclusión en los estudios de revisión fueron:

1. Surveillance OR monitor* = Sistemas de vigilancia o monitorización de enfermedades/patógenos

2. Pathogen OR disease = Aplicado o aplicable a enfermedades transmisibles y zoonóticas
3. Prioritisation OR prioritization = Se aplica a las enfermedades/especies/protocolos en los sistemas de vigilancia
4. Se presentación criterios/herramientas/métodos para la priorización = Proporciona elementos para: priorizar enfermedades/especies/protocolos o priorizar los criterios para la priorización.
5. Finalmente se seleccionaron aquellas referencias que presentaron un ranking de patógenos como consecuencia del ejercicio de priorización.

Priorización de enfermedades infecciosas en el contexto Una Única Salud: ¿qué tal la tuberculosis?

Los estudios incluidos utilizaron principalmente una de seis metodologías para priorizar los riesgos de enfermedad: índice bibliométrico, técnica Delphi, análisis de decisión de criterios múltiples (MCDA), algoritmos cualitativos, cuestionarios y matriz multidimensional. La mayoría de los estudios incluidos en esta revisión siguieron un enfoque muy similar a la clasificación de riesgos: identificación de enfermedades para la clasificación, identificación de criterios de evaluación, ponderación de criterios, puntuación de enfermedades frente a criterios y producción de una lista clasificada de enfermedades.

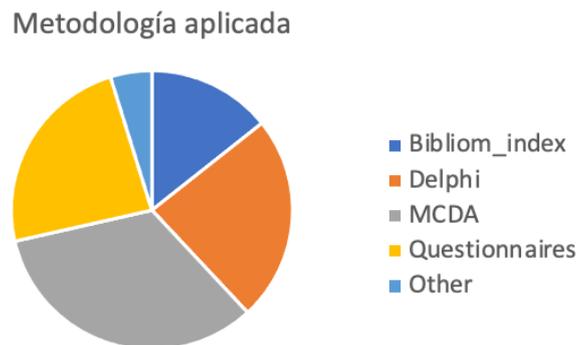


Figura 1. metodología de priorización aplicada se presenta en las 20 referencias que incluyeron al *CMT*, 3 *M. avium*, y 3 *M. avium paratuberculosis* (or Johne's disease).

Literature review on disease ranking tools, their characterisation and recommendation for the method to be used by EFSA

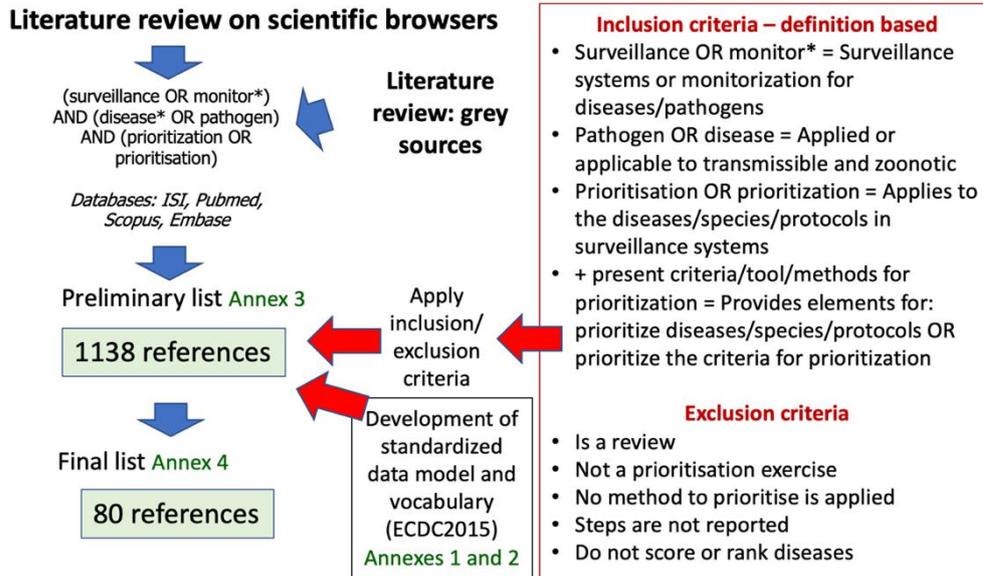


Figura 2. Procedimiento y pasos realizados para la revisión de la literatura sobre herramientas de clasificación de enfermedades y su caracterización en el presente informe. De estas 80 referencias, 37 aportan un ranking de patógenos, y 20 incluyeron al *Complejo Mycobacterium tuberculosis*, (CMTB), 3 *M. avium*, y 3 *M. avium paratuberculosis* (or Johne’s disease). La metodología de priorización aplicada se presenta en la figura 2. El CMTB fue incluido en 7 estudios centrados en Europa., en continente donde más ejercicios de priorización fueron descritos, junto a otros continentes del viejo mundo (África y Asia). En la mayoría de casos (13), los rankings se enfocaron en patógenos que eran zoonóticos., u en menor medida en enfermedades ano ales (5) o exclusivamente humanas (2). Los principales motivos por los cuales se realizaron estos rankings fueron para diseñar la futura vigilancia sanitaria (>50 %), o para priorizar recursos de ésta (40%). La selección de criterios de evaluación fue mayoritariamente desarrollada por paneles de expertos. El tipo de criterios usados fue variable y diverso, y fueron valorados (puntuados) igualmente mayoritariamente por paneles de expertos. La mitad de ranking se centraron en tuberculosis humana, y la otra se refirieron a tuberculosis bovina.

Así, el CMTB en nuestro ámbito europeo adquirió su mayor relevancia relativa en estos ejercicios de priorización en el entorno de 2010, después de una década en la que afloraron. numerosos trabajos científicos en Europa, revelando la importancia de los hospedadores silvestres para el mantenimiento y transmisión del CMTB al ganado (Figura 3).

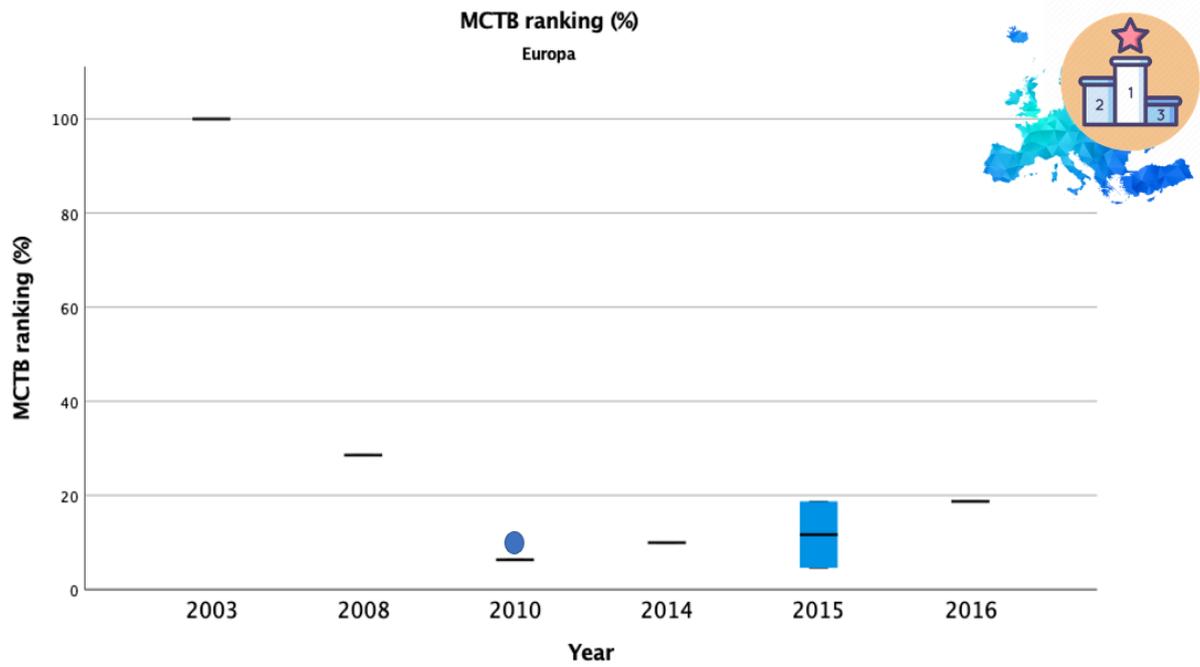
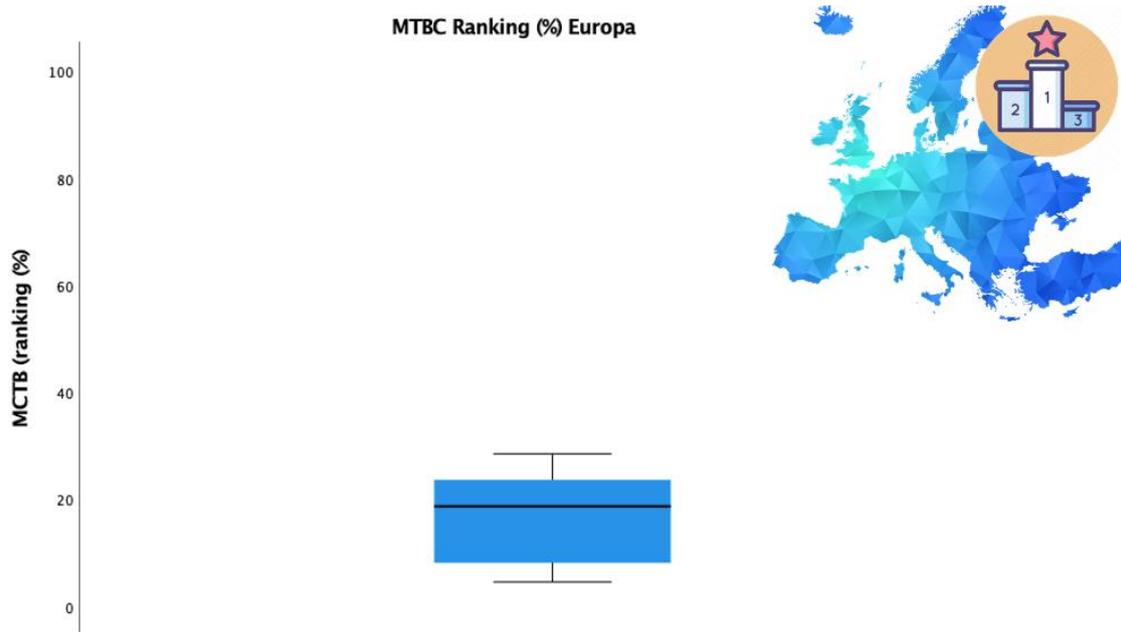


Figura 3. En el ámbito europeo, el CMTB adquirió su mayor relevancia relativa en los ejercicios de priorización en el entorno de 2000.

En esta revisión de ejercicios de priorización de los patógenos en función de objetivos, criterios y contextos muy variables, se ha podido determinar que la tuberculosis animal en nuestro contexto europeo habitualmente se considera en el entorno el 20% de patógenos más relevantes, particularmente cuando se evalúa junto a otros patógenos zoonóticos o animales (Figura 4), en niveles parecidos a otros continentes del viejo mundo. En el ámbito de la evaluación de enfermedades que afecta a humanos, sin embargo, adquirió un ranking poco relevante (en torno al 80%).



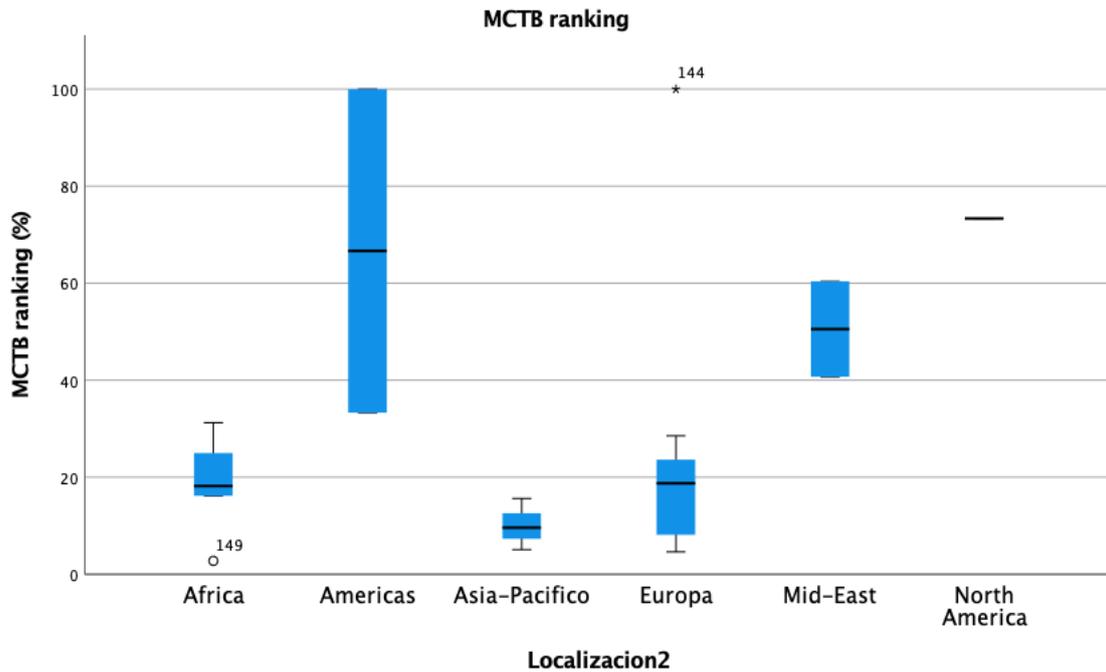


Figura 4. En esta revisión de ejercicios de priorización, se ha podido determinar que la tuberculosis animal en nuestro contexto europeo habitualmente se considera habitualmente al menos entre el 20% de patógenos más relevantes.

Podemos concluir que la utilidad de estos rankings está condicionada por los objetivos y motivaciones con que se plantean, y estos ejercicios de priorización han de ser interpretados cuidadosamente para ser útiles en las futuras políticas vigilancia sanitaria, pero flexibles para adecuarse a una aproximación OH real. No hay muchos rankings, si bien son valiosos, ya que cada uno de ellos requiere gran esfuerzo y logística. Se ha podido constatar que, según los objetivos del ejercicio concreto de priorización, el CMTB ha sido incluido en la lista de patógenos previa casi sin excepción cuando así se requería. Es llamativo que estos rankings tienden a realizarse asociados a la existencia de crisis sanitarias, algunas de carácter global, lo que influye en la importancia relativa que se otorga a diferentes patógenos en el momento. Así, el CMTB en nuestro ámbito europeo adquirió su mayor relevancia relativa en estos ejercicios de priorización en el entorno de 2000, después de una década en la que afloraron numerosos trabajos científicos en Europa, revelando la importancia de los hospedadores silvestres para el mantenimiento y transmisión del CMTB al ganado. Una reflexión final es que los rankings para patógenos, considerados estos de manera individual, pierden parte de su sentido como herramienta para decidir políticas de vigilancia sanitaria cuando la aproximación es OH. En este caso, gana en importancia la definición de una “matriz de hospedadores/patógenos/ambiente” ideal (sistema multi-patógeno multi-hospedador) sobre la que se puede diagnosticar de manera transversal.

Bibliografía

ENETWILD-consortium, Ezio Ferroglio, Alessandra Avagnina, Patricia Barroso, Francesco Benatti, Beatriz Cardoso, Azahara Gómez, Catarina Goncalves, Aleksija Neimanis, Manuela Poncina, Carmen Ruiz Rodríguez, Rachele Vada, Joaquín Vicente, Stefania Zanet, Dolores-Gavier-Widén. 2022. Literature review on disease ranking tools, their characterisation, and recommendations for the method to be used by EFSA. EFSA Supporting Publications 19, 9, 7578E, <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2022.EN-7578>

PONENCIAS DE LOS GRUPOS DE INVESTIGACIÓN



Grupo de investigación GISAZ (Sanidad animal y Zoonosis) Universidad de Córdoba



Ignacio García Bocanegra
M^a Ángeles Riscalde Moya
Jorge M^a Paniagua Risueño
David Cano Terriza
Saúl Jiménez Ruiz
Javier Caballero Gómez

Remigio Martínez Pérez
Moisés Gonzalvez Juan
Débora Jiménez Martín
Sabrina Castro Scholten
Irene Agulló Ros
Jesús Barbero Moyano

Adrián Beato Benítez
Borja José Nadales Martín
Salvador Rejón Segura
Leonor Muñoz Fernández
Tomás Fajardo Alonso

Contacto: Ignacio García Bocanegra

Correo: gisazcordoba@gmail.com

Página web: <http://gisaz.org/>

Historia

El grupo de investigación en Sanidad animal y Zoonosis (GISAZ) está constituido por un equipo multidisciplinar de investigadores e investigadoras adscritos al Departamento de Sanidad Animal y al Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas y Toxicología de la Universidad de Córdoba (UCO). Desde su creación en 2018, su principal línea de investigación es el estudio de enfermedades infecto-contagiosas de interés en

sanidad animal, salud pública y conservación de la biodiversidad, especialmente zoonosis y enfermedades emergentes. Con respecto a la tuberculosis (TB), el grupo de investigación tiene demostrada experiencia en la epidemiología y el diagnóstico de la enfermedad en animales domésticos y fauna silvestre, así como en el estudio y desarrollo de medidas para su control. El equipo investigador de este grupo ha liderado y participado, siempre en colaboración con otros grupos de investigación, diversos proyectos y contratos de investigación relacionados con la epidemiología, patogenia, diagnóstico y control de la TB animal. Además, ha colaborado y participado como asesor científico con diferentes administraciones públicas (Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación (MAPA); Consejería de Agricultura, Pesca, Agua y Desarrollo Rural, y Consejería de Sostenibilidad, Medio Ambiente y Economía Azul de la Junta de Andalucía) en diferentes proyectos de investigación y programas de formativos.

Avances de la investigación entre 2019-2022

En los últimos años el grupo GISAZ ha continuado realizando los análisis epidemiológicos y serológicos, la elaboración de informe de resultados y el asesoramiento científico en el Programa de vigilancia epidemiológica de la fauna silvestre (PVE) de la Consejería de Sostenibilidad, Medio Ambiente y Economía Azul de la Junta de Andalucía (Ref. 1). Con respecto a la tuberculosis, los resultados obtenidos en los diferentes PVE durante el periodo 2009-2021, señalan la importancia de algunas especies de ungulados silvestres en la epidemiología de la tuberculosis animal en Andalucía, y en particular, evidencian el papel del jabalí como el principal reservorio silvestre de esta enfermedad en Andalucía, así como la necesidad de continuar con la vigilancia epidemiológica en estas especies en nuestra Comunidad Autónoma.

En el campo del diagnóstico se han validado pruebas en numerosas especies domésticas y silvestres, en colaboración con IREC, ISCIII, VISAVET, Ingenasa o Chembio. Gracias a estas colaboraciones, ha habido un progreso considerable en el diagnóstico serológico de la TB en caprino y animales de vida silvestre, siendo este tipo de herramientas especialmente importantes y útiles en suidos, domésticos y silvestres (Ref. 3-7); interesante para estudios de seroprevalencia a nivel poblacional en el ganado caprino (Ref. 8); mientras que los estudios poblacionales para monitorizar la TB en cérvidos deberían estar apoyados por análisis patológicos complementarios (Ref. 7,9,10).

Durante los últimos años, nuestros estudios en el control de la enfermedad se han focalizado en la interfaz fauna-ganado, en la inmunoprofilaxis y en la bioseguridad. Se han desarrollado nuevos protocolos de bioseguridad aplicables al bovino (Ref. 11) y al porcino extensivo (Ref. 12), en colaboración con el IREC, lo que supone un avance en la mitigación de riesgos de la TB. Además, nuestro grupo de investigación ha organizado Cursos de formación especializada destinados a veterinarios de los Servicios Veterinarios Oficiales, encargados de realizar, comprobar y evaluar la idoneidad de las auditorías de bioseguridad en explotaciones ganaderas extensivas situadas en comarcas de especial riesgo en el marco del Real Decreto 138/2020, encargados por el MAPA. En cuanto a los estudios de inmunización, en colaboración con VISAVET, IREC y NEIKER, entre otros, se ha evaluado la eficacia de micobacterias inactivadas y atenuadas frente a la TB caprina (Ref. 13, 14). Así mismo, este consorcio ha desarrollado diversos ensayos experimentales que han evidenciado una protección inespecífica de distintos inmunoestimulantes (micobacterias inactivadas por calor y alpha-Gal) frente a patógenos heterólogos (ej. *Salmonella Choleraesuis* o *Mycobacterium marinum*) (Ref. 15, 16, 17, 18), en un concepto de inmunidad entrenada.

Futuro

En los próximos años se pretenden continuar con las líneas de trabajo actuales, llevar a cabo nuevos estudios de investigación y concluir algunos iniciados recientemente. Entre las líneas a desarrollar, en colaboración con otros grupos de investigación, se incluyen:

Epidemiología:

- Continuar con la monitorización del estatus sanitario en las poblaciones de ungulados silvestres en relación a la TB en Andalucía.
- Establecer la seroprevalencia, distribución espacial y factores de riesgo asociados con la seropositividad a Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) en pequeños rumiantes en Andalucía.
- Evaluar la exposición al CMT en las poblaciones de cabra montés en Andalucía.
- Realizar estudios espacio-temporales de los espoligotipos del CMT circulantes en distintas especies de hospedadores a nivel nacional.
- Desarrollar un proyecto de transición ecológica que abordará el efecto de los cambios de uso del suelo en los últimos 30 años sobre las comunidades bióticas y los patógenos multi-hospedador, entre los que se encuentran las micobacterias del CMT.

Diagnóstico

- Evaluar y comparar técnicas de diagnóstico no oficiales para la confirmación del diagnóstico de la TB en caprino, así como estudiar el efecto de la edad y la vacunación frente a la paratuberculosis en el diagnóstico.

Control

- Profundizar en el conocimiento de la dinámica de transmisión del CMT en explotaciones de cerdo criado en sistemas de producción extensivos, con especial interés al periodo de montanera como factor de riesgo, con el objetivo de implementar los protocolos de bioseguridad desarrollados para la interfaz fauna-ganado.
- Explorar las principales poblaciones celulares y mediadores inmunológicos implicados en la formación y el desarrollo de granulomas tuberculosos para el estudio de la patogenia de esta enfermedad y la evaluación de la eficacia de diferentes candidatos vacunales.
- Estudiar los mediadores inmunológicos implicados en la protección inespecífica de diferentes inmunoestimulantes derivados de micobacterias en modelos experimentales *in vitro*.

Resumen

Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB			
Campo	Resultado	Aplicación	Referencia
Epidemiología	Circulación endémica, así como una amplia y heterogénea distribución espacial de CMT en jabalí y algunas especies de cérvidos en Andalucía. <i>Mycobacterium caprae</i> (<i>M. caprae</i>) representó casi la mitad de los aislados en jabalí. Detección, por primera vez, de anticuerpos frente a CMT en cabra montés.	Necesidad de llevar a cabo una vigilancia epidemiológica en ungulados silvestres e implementar medidas de lucha para el control de la TB en estas especies.	1
	La identificación de espoligotipos compartidos de MTC en bovinos y rumiantes silvestres, con interacciones no estrechas, en el Parque Nacional de Doñana confirman la circulación intraespecífica.	La vigilancia epidemiológica y los programas de control deben llevarse a cabo en escenarios multi-hospedador.	2
Diagnóstico	El ELISA-P22, el inmunoensayo multiantígeno de impresión (MAPIA) y los ensayos de flujo lateral presentan una alta sensibilidad y especificidad para el diagnóstico <i>ante mortem</i> y <i>post mortem</i> de la TB en cerdo y jabalí.	Aplicación de ensayos serológicos es una herramienta eficaz para la vigilancia de la TB a gran escala en suidos domésticos y silvestres.	3, 4, 5, 6, 7
	Los análisis serológicos por sí solos no son suficientemente fiables para la vigilancia de la TB a grandes escalas espaciotemporales en ciervos. Se recomienda combinar con evaluaciones patológicas.	Necesidad de realizar más investigaciones sobre el uso de la serología para el diagnóstico de la TB en ciervos en condiciones de campo.	7,9,10
Control	Desarrollo de protocolos de bioseguridad detallados, específicos y sistemáticos, aplicables a los sistemas de producción bovina y porcina en extensivo.	Aplicación los protocolos para la reducción de las interacciones entre fauna silvestre y ganado y, por tanto, la prevención de la transmisión de CMT.	11, 12
	Las vacunas atenuadas MTBVAC y BCG demostraron ser inmunogénicas y efectivas para reducir la gravedad de la patología de TB causada por <i>M. caprae</i> en cabras.	Proveer datos sobre candidatos vacunales de TB para el control de la enfermedad.	13, 14
	Protección inespecífica de distintos inmunoestimulantes frente a patógenos heterólogos, en un concepto de inmunidad entrenada.	Mejora no-específica de la respuesta inmune innata frente a micobacterias y otros patógenos concomitantes.	15, 16, 17, 18

Objetivos inmediatos y su beneficio potencial para el control de TB		
Campo	Objetivo	Beneficio
Epidemiología	Monitorizar el estatus sanitario en las poblaciones de ungulados silvestres con relación a la TB.	Conocer la distribución de la TB en la fauna silvestre y aplicar los conocimientos a los programas de lucha frente a la TB animal en Andalucía.
	Conocer la seroprevalencia, distribución espacial y factores de riesgo asociados con la seropositividad a CMT en pequeños rumiantes en Andalucía.	Contribuir al desarrollo de medidas de lucha para el control de la TB en especies domésticas, así como a un uso más eficiente de los recursos disponibles.
	Estudio espacio-temporal de los espoligotipos del CMT circulantes en distintas especies de hospedadores a nivel nacional.	Conocer la circulación y distribución de los espoligotipos de CMT más abundantes en nuestro entorno, así como su capacidad de transmisión entre especies.
Diagnóstico	Evaluar distintas técnicas de diagnóstico no oficiales para la confirmación del diagnóstico de la TB en caprino.	Profundizar en la eficacia de métodos de diagnóstico alternativos para la TB caprina, así como estudiar el efecto de la edad y la vacunación frente a la paratuberculosis.
Control	Conocer la dinámica de transmisión del CMT en explotaciones de cerdo criado en sistemas de producción extensivos, con especial interés en el periodo de montanera como factor de riesgo.	Diseño e implementación de programas de bioseguridad personalizados para mitigar los riesgos de aparición de enfermedades transmisibles.
	Profundizar en el conocimiento de la patogenia de la TB caprina.	Proponer diferentes marcadores inmunológicos relevantes para la evaluación de la eficacia de diferentes candidatos vacunales frente a la TB animal.
	Estudiar los mediadores inmunológicos implicados en la protección inespecífica de diferentes inmunoestimulantes mediante modelos experimentales in vitro.	Obtención de nuevas vacunas e inmunoestimulantes frente a las micobacteriosis.

Publicaciones derivadas

1. Programa de vigilancia epidemiológica de la fauna silvestre en Andalucía (PVE). https://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/portal/landing-page-%C3%ADndice/-/asset_publisher/zX2ouZa4r1Rf/content/programa-de-vigilancia-epidemiol-c3-b3gica-de-la-fauna-silvestre-en-andaluc-c3-ada-pve--1/20151
2. Jiménez-Ruiz, S., García-Bocanegra, I., Acevedo, P., Espunyes, J., Triguero-Ocaña, R., Cano-Terriza, D., Torres-Sánchez, M.J., Vicente, J., & Risalde, M.Á. (2022). A survey of shared pathogens at the domestic-wild ruminants' interface in Doñana National Park (Spain). *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(3), 1568-1576. DOI: 10.1111/tbed.14126.
3. Fresco-Taboada, A., Risalde, M.A., Gortázar, C., Tapia, I., González, I., Venteo, Á., Sanz, A., & Rueda, P. (2019). A lateral flow assay for the rapid diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in wild boar. *Transboundary and Emerging Diseases*, 66(5), 2175-2179. DOI: 10.1111/tbed.13260.
4. Miller, M.A., Gortazar, C., Roos, E.O., Risalde, M.A., Johnathan-Lee, A., Sridhara, A. A., & Lyashchenko, K.P. (2019). Serological reactivity to MPB83 and CFP10/ESAT-6 antigens in three suid hosts of *Mycobacterium bovis* infection. *Veterinary Microbiology*, 235, 285-288. DOI: 10.1016/j.vetmic.2019.07.018.
5. Thomas, J., Infantes-Lorenzo, J.A., Moreno, I., Cano-Terriza, D., de Juan, L., García-Bocanegra, I., Domínguez, L., Domínguez, M., Gortázar, C., & Risalde, M.A. (2019). Validation of a new serological assay for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex-specific antibodies in pigs and wild boar. *Preventive Veterinary Medicine*, 162, 11-17. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2018.11.004.
6. Sridhara, A.A., Johnathan-Lee, A., Elahi, R., Risalde, M.A., Gortazar, C., Waters, W.R., Lyashchenko, K.P., & Miller, M.A. (2021). Strong antibody responses to *Mycobacterium bovis* infection in domestic pigs and potential for reliable serodiagnostics. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 231, 110161. doi: 10.1016/j.vetimm.2020.110161.
7. Thomas, J., Balseiro, A., Gortázar, C., & Risalde, M.A. (2021). Diagnosis of tuberculosis in wildlife: a systematic review. *Veterinary Research*, 52(1), 1-23. DOI: 10.1186/s13567-020-00881-y.
8. Infantes-Lorenzo, J.A., Moreno, I., Roy, A., Risalde, M.A., Balseiro, A., de Juan, L., Romero, B., Bezos, J., Puentes, E., Åkerstedt, J., Tessema, G.T., Gortázar, C., Domínguez, L., & Domínguez, M. (2019). Specificity of serological test for detection of tuberculosis in cattle, goats, sheep and pigs under different epidemiological situations. *BMC Veterinary Research*, 15(1), 1-8. DOI: 10.1186/s12917-019-1814-z.
9. Thomas, J., Infantes-Lorenzo, J.A., Moreno, I., Romero, B., Garrido, J. M., Juste, R., Domínguez, M., Domínguez, L., Gortazar, C., & Risalde, M.A. (2019). A new test to detect antibodies against *Mycobacterium tuberculosis* complex in red deer serum. *The Veterinary Journal*, 244, 98-103. DOI: 10.1016/j.tvjl.2018.12.021.
10. Ferreras-Colino, E., Moreno, I., Arnal, M.C., Balseiro, A., Acevedo, P., Domínguez, M., Fernández de Luco, D., Gortázar, C., & Risalde, M.A. (2022). Is serology a realistic approach for monitoring red deer tuberculosis in the field?. *Preventive Veterinary Medicine*, 202, 105612. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2022.105612.
11. Martínez-Guijosa, J., Lima-Barbero, J.F., Acevedo, P., Cano-Terriza, D., Jiménez-Ruiz, S., Barasona, J.Á., Boadella, M., García-Bocanegra, I., Gortázar, C. & Vicente, J. (2021). Description and implementation of an On-farm Wildlife Risk Mitigation Protocol at the wildlife-livestock interface: Tuberculosis in Mediterranean environments. *Preventive Veterinary Medicine*, 191, 105346. DOI:10.1016/j.prevetmed.2021.105346.
12. Jiménez-Ruiz, S., Laguna, E., Vicente, J., García-Bocanegra, I., Martínez-Guijosa, J., Cano-Terriza, D., Risalde, M.A., & Acevedo, P. (2022). Characterization and management of interaction risks between livestock and wild ungulates on outdoor pig farms in Spain *Porcine Health Management*, 8(1), 2. DOI: 10.1186/s40813-021-00246-7.

13. Roy, A., Tomé, I., Romero, B., Lorente-Leal, V., Infantes-Lorenzo, J.A., Domínguez, M., Martín, C., Aguiló, N., Puentes, E., Rodríguez, E., de Juan, L., Risalde, M.A., Gortázar, C., Domínguez, L., & Bezos, J. (2019). Evaluation of the immunogenicity and efficacy of BCG and MTBVAC vaccines using a natural transmission model of tuberculosis. *Veterinary Research*, 50(1), 1-13. DOI: 10.1186/s13567-019-0702-7.
14. Balseiro, A., Thomas, J., Gortázar, C., & Risalde, M. A. (2020). Development and challenges in animal tuberculosis vaccination. *Pathogens*, 9(6), 472. DOI: 10.3390/pathogens9060472.
15. Risalde, M.A., Roy, Á., Bezos, J., Pineda, C., Casal, C., Díez-Guerrier, A., Lopez-Villalba, I., Fernández-Manzano, Á., Moreno, I., De Juan, L., Domínguez, L., & Gortazar, C. (2019). Hypervitaminosis D has no positive effects on goat tuberculosis and may cause chronic renal lesions. *Veterinary Record*, 185(24), 759-759. DOI: 10.1136/vr.105411
16. Pacheco, I., Contreras, M., Villar, M., Risalde, M.A., Alberdi, P., Cabezas-Cruz, A., Gortázar, C., & de la Fuente, J. (2020). Vaccination with alpha-Gal protects against mycobacterial infection in the zebrafish model of tuberculosis. *Vaccines*, 8(2), 195. DOI: 10.3390/vaccines8020195.
17. Juste, R.A., Ferreras-Colino, E., de la Fuente, J., Domínguez, M., Risalde, M.A., Domínguez, L., Cabezas-Cruz, A. & Gortázar, C. (2022). Heat inactivated mycobacteria, alpha-Gal and zebrafish: Insights gained from experiences with two promising trained immunity inductors and a validated animal model. *Immunology*, 167 (2), 139-153. DOI: 10.1111/imm.13529.
18. Vaz-Rodrigues, R., Ferreras-Colino, E., Ugarte-Ruíz, M., Pesciaroli, M., Thomas, J., García-Seco, T., Sevilla, I.A., Pérez-Sancho, M., Mateo, R., Domínguez, L., Gortazar, C., & Risalde, M.A. (2022). Nonspecific protection of heat-inactivated *Mycobacterium bovis* against *Salmonella Choleraesuis* infection in pigs. *Veterinary Research*, 53(1), 33. DOI: 10.1186/s13567-022-01047-8.

Proyectos de Investigación o contratos financiados

1. **Título del proyecto:** Non-specific immunity associated to inactivated mycobacteria: range of pathogens, immunogen specificity and molecular mechanisms implicated. MYCOTRAINING. SBPLY/19/180501/000174
Entidad financiadora: Junta de Comunidades de Castilla - La Mancha
Duración: desde enero 2020 hasta enero 2023
Investigador principal: María Á. Risalde Moya, Christian Gortázar Schmidt
2. **Título del proyecto:** Protección y eficacia terapéutica del complejo P22 frente a la tuberculosis caprina: inmunogenicidad y mecanismos moleculares implicados. REF: 1381385-R
Entidad financiadora: TBGo-P22.
Duración desde: 01-01-2022 hasta: 31-12-2022
Investigador principal: María Á. Risalde Moya
3. **Título del proyecto:** Efecto de los cambios en los usos del suelo sobre la salud ambiental y la diversidad de patógenos en el marco de la inmunidad del paisaje. Ref: TED2021-132599B-C22
Entidad financiadora: Ministerio de Ciencia e Innovación
Duración desde: 1/12/2022 hasta: 1/12/2024
Investigador principal: M^a Ángeles Risalde Moya, Ignacio García Bocanegra.
4. Servicio para la realización de analíticas de enfermedades del programa Vigilancia epidemiológica de la fauna silvestre en Andalucía y servicio científico-técnico para el estudio de su estatus sanitario. Contrato artículo 83. NET275495

- Organización financiadora:** Agencia de Medio Ambiente y Agua (AMAA). Junta de Andalucía. **Duración:** desde 24 julio 2020 hasta 24 julio 2023.
5. Diagnóstico de enfermedades infectocontagiosas de importancia en Sanidad Animal y Salud Pública. Contrato artículo 83. NET12020049
Organización financiadora: Diversas empresas y entidades.
Duración: desde 2 octubre 2020 hasta 1 octubre 2022
 6. Evaluación del progreso y las actuaciones futuras en los programas nacionales de erradicación de la tuberculosis en animales. Contrato artículo 83. NET12022097.
Organización financiadora: Dirección general de sanidad de la producción agraria (MAPA)
Duración: desde 15/07/2022 (1 año 6 meses)
 7. Diseño, implantación y evaluación de programas sanitarios para la mitigación del riesgo de transmisión de la tuberculosis en el ganado porcino extensivo (TB-PORCEX). Contrato artículo 83. NET12018158
Organización financiadora: Junta de Extremadura. Solano Veterinaria y Nutrición S.L.
Duración: desde 4 octubre 2018 hasta 4 abril 2021
 8. Cursos de formación especializada destinados a veterinarios de los Servicios Veterinarios Oficiales, encargados de realizar o comprobar y evaluar la idoneidad de las auditorías de bioseguridad en explotaciones ganaderas extensivas situadas en comarcas de especial riesgo en el marco del Real Decreto 138/2020. REF. 12021204
Organización financiadora: Ministerio De Agricultura, Pesca Y Alimentación
Duración: 14/12/2021 hasta 14/06/2022
 9. Evaluación del progreso y las actuaciones futuras en los programas nacionales de erradicación de la tuberculosis en animales. Contrato artículo 83. NET12022097.
Organización financiadora: Dirección general de sanidad de la producción agraria (MAPA)
Duración: desde 15/07/2022 (1 año 6 meses)
 10. Diseño, implantación y evaluación de programas sanitarios para la mitigación del riesgo de transmisión de la tuberculosis en el ganado porcino extensivo (TB-PORCEX). Contrato artículo 83. NET12018158
Organización financiadora: Junta de Extremadura. Solano Veterinaria y Nutrición S.L.
Duración: desde 4 octubre 2018 hasta 4 abril 2021
 11. Cursos de formación especializada destinados a veterinarios de los Servicios Veterinarios Oficiales, encargados de realizar o comprobar y evaluar la idoneidad de las auditorías de bioseguridad en explotaciones ganaderas extensivas situadas en comarcas de especial riesgo en el marco del Real Decreto 138/2020. REF. 12021204
Organización financiadora: Ministerio De Agricultura, Pesca Y Alimentación
Duración: 14/12/2021 hasta 14/06/2022

UCO-PIG (Pathology and Immunology Group) (AGR-137)

UCO-PIG



Jaime Gómez Laguna
Librado Carrasco Otero
Francisco José Pallarés Martínez
Inmaculada Barranco Cabezudo
Irene M. Rodríguez Gómez

Jose María Sánchez Carvajal
Inés Ruedas Torres
Fernanda Larenas Muñoz
Carmen Álvarez Delgado
Karola Fristiková

Contacto: Jaime Gómez Laguna

j.gomez-laguna@uco.es

https://twitter.com/uco_pig

Historia

El grupo UCO-PIG (Pathology and Immunology Group), de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba, está constituido por un equipo de investigadores pertenecientes al AGR-137 "Anatomía Patológica Animal" del Plan Andaluz de Investigación, Desarrollo e Innovación (PAIDI). Las líneas de investigación del grupo UCO-PIG se centran en el estudio de la respuesta inmune y patogenicidad de los principales patógenos de interés en los animales de producción, así como en el desarrollo de nuevas herramientas de inmunoprofilaxis.

El grupo UCO-PIG cuenta actualmente con 7 doctores (2 Catedráticos, 1 Profesor Titular, 2 Profesoras Contratadas Doctor y 2 Investigadores Postdoctorales) y 3 estudiantes de doctorado, de los cuales dos están desarrollando sus tesis doctorales en el campo de la tuberculosis animal; una de ellas centrada en la caracterización inmunopatogénica de las lesiones granulomatosas provocados por el complejo *Mycobacterium tuberculosis* en nódulos linfáticos de ganado bovino y porcino; y la otra centrada en la evaluación de alternativas de alimentación dirigida para fortalecer la respuesta inmune del hospedador y minimizar la generalización de las lesiones asociadas a la tuberculosis. Adicionalmente, nuestro grupo está codirigiendo otra tesis doctoral, junto con el grupo AGR-256, cuyos estudios están centrados en la validación de nuevos protocolos de qPCR y ddPCR para la detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis* a partir de muestras de tejido fresco.

El grupo de investigación UCO-PIG lleva más de dos décadas trabajando con las empresas del sector para favorecer el desarrollo e implementación de herramientas de diagnóstico y control frente a la tuberculosis en ganadería. Dentro de esta línea de investigación el grupo ha participado en numerosos proyectos investigación a nivel autonómico y nacional. Asimismo, el grupo tiene una elevada capacidad de transferencia al sector, tanto en forma de contratos de investigación (art. 83) con empresas, como a través de contribuciones en revistas de divulgación.

Avances de la investigación entre 2019-2022

El grupo UCO-PIG (AGR-137), en colaboración con el grupo AGR-256, ha realizado varios estudios sobre tuberculosis animal que han estado enmarcados dentro de un proyecto de investigación autonómico, coordinado con el Laboratorio de Producción y Sanidad Animal de Córdoba (LPSACo, Junta de Andalucía) y la Cooperativa Ganadera del Valle de los Pedroches (COVAP), titulado, “Nuevas medidas y técnicas de control de la tuberculosis bovina en Andalucía” (GOP2I-CO-16-0010). Los principales objetivos de este proyecto eran:

- Desarrollar protocolos de diagnóstico de base molecular para mejorar el rendimiento diagnóstico frente al complejo *Mycobacterium tuberculosis* en muestras de tejido fresco.
- Evaluar el papel de la histopatología en el diagnóstico sistemático de la tuberculosis bovina y su papel como herramienta diagnóstica alternativa para los programas de vigilancia y control de la tuberculosis animal a nivel nacional.

En la actualidad estamos trabajando en un proyecto de investigación autonómico colaborativo, junto con los grupos de investigación GISAZ (AGR-149) y AGR-256 de la UCO, titulado, “Diseño y evaluación de estrategias de lucha integrada para el control de enfermedades transmisibles en cerdos en sistemas silvopastorales en Andalucía”. Dentro de este proyecto las actuaciones de nuestro grupo están enmarcadas en el desarrollo de estrategias alimenticias e inmunomoduladoras para fortalecer el sistema inmune innato del cerdo y su respuesta frente a patógenos pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis*, disminuyendo de esta forma no solo transmisión de estos patógenos en los sistemas extensivos de dehesa del suroeste de la península Ibérica, donde estos animales se crían en libertad, sino también reducir las lesiones producidas por estos u otros patógenos, y por tanto los decomisos derivados de estas y las pérdidas económicas derivadas.

Futuro

En los próximos años se pretenden llevar a cabo nuevos estudios de investigación y concluir algunos iniciados recientemente. Entre las líneas a desarrollar, en colaboración con otros grupos de investigación, se incluyen:

- El desarrollo de protocolos alternativos de diagnóstico basados en PCR en tiempo real frente al complejo *Mycobacterium tuberculosis*: IS6110, IS4 y mpb70.
- La evaluación de la PCR digital de gotas (ddPCR) dirigida frente a IS6110 para detectar ADN del complejo *Mycobacterium tuberculosis* a partir de muestras de cultivo microbiológico y de tejido fresco.
- La evaluación de la inclusión de paraprobióticos basados en micobacterias inactivadas en la alimentación del ganado porcino y su impacto sobre la respuesta inmune y generalización de las lesiones asociadas a tuberculosis.
- El uso de herramientas de espectrometría de masas de imágenes MALDI-IMS para la identificación de biomarcadores de interés en el desarrollo y progresión de las lesiones asociadas a la tuberculosis en distintas especies animales.

Resumen

Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB			
Campo	Resultados	Aplicación	Referencia
Diagnóstico	Desarrollo de protocolos de diagnóstico para mejorar el rendimiento diagnóstico frente al complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en muestras de tejido fresco.	Implementar pruebas de diagnóstico en los programas de vigilancia y control de la tuberculosis animal a nivel nacional, reduciendo el tiempo de confirmación y la toma de decisiones, así como reducir los costes económicos.	1,2

Objetivos inmediatos y su beneficio potencial para el control de TB		
Campo	Objetivo	Beneficio
Diagnóstico	Desarrollo de protocolos de diagnóstico de base molecular, droplet digital PCR (ddPCR), para mejorar el rendimiento diagnóstico frente al complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> a partir de muestras de tejido.	Implementación de pruebas de diagnóstico de base molecular en los programas de vigilancia y control de la tuberculosis animal a nivel nacional, reduciendo el tiempo de confirmación y la toma de decisiones, así como reducir los costes económicos.
Diagnóstico	Validación del análisis del volatilo como herramienta de diagnóstico frente al complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> a partir de muestras de heces.	Desarrollo de una técnica ante mortem, portátil y no invasiva, capaz de mejorar los parámetros de sensibilidad y especificidad.
Diagnóstico	Evaluar la distribución orgánica de los agentes implicados en el desarrollo de lesiones asociadas a la tuberculosis en decomisos totales de ganado porcino criado en extensivo.	Identificación de los órganos más frecuentemente afectados por el CMT en ganado porcino para su selección para el diagnóstico y estudios epidemiológicos en los programas de vigilancia de la tuberculosis.

Control	Desarrollo de estrategias de alimentación dirigidas para potenciar el estatus inmunitario del cerdo y su respuesta frente a patógenos pertenecientes al complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	Fortalecimiento del sistema inmune innato del cerdo y su respuesta frente a patógenos pertenecientes al complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , disminuyendo la transmisión de la enfermedad en los sistemas silvopastorales del suroeste de la Península Ibérica, así como la incidencia de decomisos derivados de las lesiones producidas por estos u otros patógenos, y las pérdidas económicas derivadas.
Patogenia	Análisis comparativo entre distintas especies animales para la identificación de biomarcadores de interés para el diagnóstico y control de la infección por micobacterias pertenecientes al complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	Identificación y selección de moléculas clave en el desarrollo del granuloma tuberculoso en distintas especies animales a lo largo de la enfermedad para el desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico y control frente a la tuberculosis animal.

Publicaciones derivadas

1. Larenas-Muñoz, F., Sánchez-Carvajal, J. M., Galán-Relaño, Á., Ruedas-Torres, I., Vera-Salmoral, E., Gómez-Gascón, L., ... & Gómez-Laguna, J. (2022). The Role of Histopathology as a Complementary Diagnostic Tool in the Monitoring of Bovine Tuberculosis. *Frontiers in Veterinary Science*, 9. DOI: 10.3389/fvets.2022.816190
2. Sánchez-Carvajal, J. M., Galán-Relaño, Á., Ruedas-Torres, I., Jurado-Martos, F., Larenas-Muñoz, F., Vera, E., ... & Luque, I. (2021). Real-Time PCR validation for *Mycobacterium tuberculosis* complex detection targeting IS6110 directly from bovine lymph nodes. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 643111. DOI: 10.3389/fvets.2021.643111
3. Rodríguez-Hernández, P., Rodríguez-Estévez, V., Arce, L. & Gómez-Laguna, J. (2021). Application of volatilome analysis to the diagnosis of mycobacteria infection in livestock. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 635155. DOI: 10.3389/fvets.2021.635155
4. Cardoso-Toset, F., Gómez-Laguna, J., Gómez-Gascón, L., Rodríguez-Gómez, I.M., Galán-Relaño, A., Carrasco, L., Tarradas, C., Vela, A.I., & Luque, I. (2020). Histopathological and microbiological study of porcine lymphadenitis: contributions to diagnosis and control of the disease. *Porcine Health and Management*, 6, 36. DOI: 10.1186/s40813-020-00172-0

Proyectos o contratos financiados

1. **Título del proyecto:** Diseño y evaluación de estrategias de lucha integrada para el control de enfermedades transmisibles en cerdos en sistemas silvopastorales en Andalucía (PYC20_RE_056_UCO).
Entidad financiadora: Consejería de Transformación Económica, Industria, Conocimiento y Universidades. Junta de Andalucía.
Duración: 01/06/2021-31/12/2022
Investigador principal: J. Gómez-Laguna, I. García-Bocanegra & I. Luque.
2. **Título del proyecto:** CEIA3-UCO 2019 (AGR-137) - ProyectoAgroMIS: ceiA3 Instrumento estratégico hacia un tejido productivo Agroalimentario Moderno, Innovador y Sostenible: motor del territorio rural andaluz. Sublínea: SL2422 (Ref. A1122062E0_AGROMIS)
Entidad financiadora: Consejería de Economía, Conocimiento, Empresas y Universidades. Junta de Andalucía.
Duración: 14/04/2020-30/06/2022
Investigador principal: Librado Carrasco.
3. **Título del proyecto:** Innotuber-Nuevas medidas y técnicas de control de la tuberculosis bovina en Andalucía (Subproyecto AGR-137) (Ref. GOP2I-CO-16-0010). Ayudas para el Funcionamiento de los Grupos Operativos de la Asociación Europea de Innovación (AEI) en materia de productividad y sostenibilidad agrícola (operación 16.1.2.)
Entidad financiadora: Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible. Junta de Andalucía.
Duración: 15/02/2018 - 15/02/2020
Investigador principal: Librado Carrasco & Jaime Gómez-Laguna.

Universidad de León



Ana Balseiro
Luis J. Royo
Miguel Prieto
Javier Amado

Pablo Quirós
Gloria Herrero-García
Cristina Blanco-Vázquez
Manuel A. Queipo

Contacto: Ana Balseiro

abalm@unileon.es

www.unileon.es

Historia

El grupo de investigación en TB de la Universidad de León (ULE) está constituido por un equipo multidisciplinar de investigadores e investigadoras adscritos al Departamento de Sanidad Animal de la ULE, al Departamento de Genética de la Universidad de Oviedo, y a la Dirección General de Medio Natural y Planificación Rural, Dirección General de Ganadería y Sanidad Animal y Laboratorio Regional de Sanidad Animal del Principado de Asturias. Desde hace más de dos décadas, este equipo viene desarrollando diversos estudios centrados principalmente en la epidemiología, diagnóstico y control de la TB. Este grupo ha llevado a cabo, siempre en colaboración con otros grupos de investigación, diversos proyectos y contratos de investigación relacionados con la TB animal en especies domésticas (rumiantes) y silvestres (tejón y jabalí), en Asturias, donde la prevalencia de la enfermedad en el ganado bovino es baja (actualmente CCAA oficialmente libre de TB), pero dónde a su vez, persisten áreas concretas con alta prevalencia.

Avances de la investigación entre 2019-2022

En estos últimos cinco años, se han realizado numerosos estudios enmarcados dentro de tres proyectos de investigación. El objetivo general del proyecto coordinado entre ULE y VISAVET (ERATUB) ha sido el control de la TB, incluyendo estudios de campo para la identificación de los factores asociados con una mayor problemática en el desarrollo de las campañas de saneamiento en zonas de alta y de baja prevalencia de tuberculosis en animales domésticos y silvestres, estudios de laboratorio para la caracterización de micobacterias capaces de interferir en el rendimiento de las pruebas diagnósticas, estudios de evaluación de posibles herramientas preventivas y diagnósticas, y estudios de modelización, poniendo en común todos los resultados obtenidos en el proyecto. En concreto, dentro del Subproyecto liderado por la ULE (BADTUB), el objetivo general ha sido

determinar si el tejón y el jabalí son especies relevantes como hospedadores de mantenimiento o reservorios de TB en ambientes atlánticos (menos estudiados que los mediterráneos), con el fin de evaluar la eficacia de posibles medidas de control de la enfermedad (ej. bioseguridad y vacunación de dichos reservorios). Dentro de los objetivos específicos se han desarrollado como estudios más relevantes los siguientes: (1) estudio de la epidemiología y evolución de la enfermedad en bovino, tejón y jabalí, en un periodo de 10 años, relacionando los resultados con la ecología del tejón y el jabalí; (2) estudio de los movimientos de especies silvestres (tejón y jabalí) y ganado doméstico (bovino), mediante collares GPS en áreas de alta prevalencia de TB en ambientes atlánticos, con el fin de estimar posibles contactos indirectos entre ellos, que pudieran facilitar la transmisión indirecta e interespecífica de la TB; (3) desarrollo de un modelo de infección experimental de vacunación frente a *M. bovis* con la vacuna *M. bovis* inactivada por calor en cebos en tejón; (4) evaluación de la eficacia vacunal de la misma, mediante el estudio y cuantificación del volumen de lesiones y de la carga bacteriana en diferentes tejidos, así como a partir del estudio de las poblaciones celulares presentes en los granulomas tuberculosos mediante inmunohistoquímica, y (5) diseño y evaluación de la eficacia de nuevas medidas de bioseguridad en las explotaciones bovinas.

Como resultados más relevantes se comprobó que los tejones y jabalíes procedentes de áreas de alta prevalencia de TB en ganado bovino, mostraban mayor positividad de TB, a la vez que fueron en los que se encontró mayor casuística de lesiones macroscópicas, indicativo de casos más graves de la enfermedad y estadios más avanzados de la misma. Además, se determinó una clara asociación espacio-temporal de la enfermedad entre el tejón, el jabalí y el ganado bovino, así como una transmisión interespecífica por contacto indirecto (demostrado mediante la colocación de collares GPS en las tres especies). En este sentido, la infección en las tres especies estuvo producida por las mismas cepas de TB. Por consiguiente, el tejón y el jabalí deben considerarse como especies relevantes en estas localizaciones, en cuanto al mantenimiento de la TB.

Por otro lado, la evaluación de la eficacia de la vacunación del tejón con la vacuna *M. bovis* inactivada por calor, administrada por vía oral directamente en las tonsilas, indujo mayor protección, en términos de reducción de la carga bacteriana y gravedad de las lesiones observadas, que la vacuna viva BCG. Sin embargo, el estudio relativo a la eficacia de la misma por la ruta de administración oral en cebo indicó que la vacuna sería eficaz en un 75% de los animales vacunados, abriendo nuevas vías de investigación para evaluar los factores individuales que determinan la protección (o no) de los animales vacunados.

Por último, el desarrollo de medidas de bioseguridad como el diseño de tolvas selectivas para ganado bovino, que impidieran el acceso a la comida de especies silvestres como el jabalí, resultó un éxito. Sin embargo, se observó como reto futuro, el mantenimiento de este tipo de medidas de bioseguridad por parte de los ganaderos.

Futuro

En los próximos años se pretenden llevar a cabo nuevos estudios de investigación y concluir algunos iniciados recientemente. Entre las líneas a desarrollar, en colaboración con otros grupos de investigación, se incluyen el estudio de la respuesta inmune local e individual en pulmón y nódulos linfáticos regionales, de tejones vacunados y no vacunados frente a TB, con la vacuna *M. bovis* inactivada por calor administrada en cebo, o nuevas pruebas de vacunación para ajustar dosis y respuesta inmune, con el objetivo de evaluar su posible administración en cebos a nivel de campo. Por otro lado, se están realizando estudios de identificación de riesgos en ganaderías positivas y negativas a TB en diferentes ecosistemas a nivel nacional, con el objetivo de aportar, tras su evaluación, medidas de control específicas para cada situación epidemiológica.

Resumen

Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB			
Campo	Resultado	Aplicación	Referencia
Epidemiología	Monitorización del estatus sanitario de las poblaciones de tejón y jabalí con relación a la TB en ambientes atlánticos.	Desarrollo de medidas de lucha para el control de la TB en tejón y jabalí.	7, 12, 13
Epidemiología	Relación de la ecología de las poblaciones de tejón y jabalí con el ganado bovino positivo a TB en áreas de alta prevalencia de TB en ambientes atlánticos.	Desarrollo de medidas de bioseguridad para el control integrado de la TB en ganado bovino, tejón y jabalí.	1, 8
Epidemiología	Papel del zorro y lobo en relación con la TB.	Estudio de los sistemas multi-hospedador de la TB.	14, 16
Diagnóstico	Sensibilidad, especificidad y estabilidad de la técnica ELISA P22 para el diagnóstico de TB en animales domésticos y fauna silvestre.	Desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico de TB para utilización en animales domésticos y fauna silvestre.	5, 9, 10, 17
Control	Vacunación de tejones, infectados experimentalmente con <i>M. bovis</i> , con <i>M. bovis</i> inactivado por calor administrado directamente en tonsilas y en cebo.	Desarrollo de medidas de lucha para el control de la TB en tejón en campo.	3, 4, 6, 11, 15
Control	Diseño de comederos selectivos para ganado bovino.	Desarrollo de medidas de bioseguridad para el control integral de la TB.	2

Objetivos inmediatos y su beneficio potencial para el control de TB		
Campo	Objetivo	Beneficio
Epidemiología	Monitorizar el estatus sanitario en las poblaciones de tejón y jabalí con relación a la TB en ambientes atlánticos.	Estudio de los sistemas multi-hospedador en hábitats atlánticos para el desarrollo de medidas de lucha para el control de la TB.
Epidemiología	Identificación de riesgos en ganaderías positivas y negativas a TB en diferentes ecosistemas.	Implantación de medidas de control específicas para cada situación epidemiológica.
Control	Pruebas de eficacia de la vacunación de tejones con <i>M. bovis</i> inactivado con calor.	Candidato vacunal frente a TB para tejón, de aplicación en campo.

Publicaciones derivadas

1. Acevedo, P., Prieto, M., Quirós, P., Merediz, I., de Juan, L., Infantes-Lorenzo, J., Triguero-Ocaña, R., & Balseiro, A. (2020). Tuberculosis epidemiology and badger (*Meles meles*) spatial ecology in a hot-spot area in Atlantic Spain. *Pathogens*. 7, 41. doi: 10.3390/pathogens8040292.
2. Balseiro, A., Oleaga, A., Álvarez Morales, L.M., González Quirós, P., Gortázar, C., & Prieto, J.M. (2019). Effectiveness of a calf-selective feeder in preventing wild boar access. *European Journal of Wildlife Research*. 65, 38. doi: 10.1007/s10344-019-1276-4.
3. Balseiro, A., Thomas, J., Gortázar, C., & Risalde, M.A. (2020a). Development and challenges in animal tuberculosis vaccination. *Pathogens*. 9, E472. doi: 10.3390/pathogens9060472.
4. Balseiro, A., Prieto, J.M., Álvarez, V., Lesellier, S., Dave, D., Salguero, F.J., Sevilla, I.A., Infantes, J.A., Garrido, J.M., Adriaensen, H., Juste, R.A., & Barral, M. (2020b). Protective effect of oral BCG and inactivated *Mycobacterium bovis* vaccines in European badgers (*Meles meles*) experimentally infected with *M. bovis*. *Frontiers in Veterinary Science*. 7, 41. doi: 10.3389/fvets.2020.00041.
5. Barral, T.D., Infantes-Lorenzo, J.A., Moreno, I., de Garnica García, M.G., Pérez de Val, B., Gortázar, C., Meyer, R., Portela, R.D., Domínguez, L., Domínguez, M., & Balseiro, A. (2022). P22 protein complex in the serodiagnosis of animal tuberculosis: Antigenic stability and cross-reactivity with *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 7, 90–91:101891. doi: 10.1016/j.cimid.2022.101891.
6. Blanco Vázquez, C., Prieto, M., Barral, M., Lesellier, S., Salguero, F.J., Davé, D., Martínez, I.Z., de Garnica García, M.G., Casais, R., & Balseiro, A. (2020). Local lung immune response to *Mycobacterium bovis* challenge after BCG and *M. bovis* heat-inactivated vaccination in European badger (*Meles meles*). *Pathogens*. 9, E456. doi: 10.3390/pathogens9060456.
7. Blanco-Vázquez, C., Barral, T.D., Romero, B., Queipo, M., Merediz, I., Quirós, P., Armenteros, J.A., Juste, R.A., Domínguez, L., Domínguez, M., Casais, R., & Balseiro, A. (2021). Spatial and temporal distribution of *Mycobacterium tuberculosis* complex infection in Eurasian badger (*Meles meles*) and cattle in Asturias, Spain. *Animals (Basel)*. 11, 1294. doi: 10.3390/ani11051294.
8. Herrero-García, G., Acevedo, P., Quirós, P., Prieto, M., Romero, B., Gortázar, C., Amado, J., Queipo, M.A., & Balseiro, A. (2022). Tuberculosis epidemiology and spatial ecology of wild boar in Atlantic Spain. *Transboundary and Emerging Diseases*. En revisión.
9. Infantes-Lorenzo, J.A., Moreno, I., Roy, A., Risalde, M.A., Balseiro, A., de Juan, L., Romero, B., Bezos, J., Puentes, E., Akerstedt, J., Tessema, G., Gortázar, C., Domínguez, L., & Domínguez, M. (2019). Specificity of serological test for detection of tuberculosis in cattle, goats, sheep and pigs under different epidemiological situations. *BMC Veterinary Research*. 17, 70. doi: 10.1186/s12917-019-1814-z.
10. Infantes-Lorenzo, J.A., Gortázar, C., Domínguez, L., Muñoz-Mendoza, M., Domínguez, M., & Balseiro, A. (2020). Serological technique for detecting tuberculosis prevalence in sheep in Atlantic Spain. *Research in Veterinary Science*. 129, 96–98. doi: 10.1016/j.rvsc.2020.01.013.
11. Juste, R.A., Blanco-Vázquez, C., Barral, M., Prieto, J.M., Varela-Castro, L., Lesellier, S., Davé, D., Sevilla, I.A., Infantes-Lorenzo, J.A., Adriaensen, H., Herrero-García, G., Garrido, J.M., Casais, R., & Balseiro, A. (2022). Efficacy of inactivated *Mycobacterium bovis* vaccine delivered to European badgers (*Meles meles*) through edible bait. *Vaccine*. En revisión.
12. Prieto, J.M., Blanco, C., Queipo, M., Álvarez, L.M., & Balseiro, A. (2020a). Prevalencia de la tuberculosis animal en tejón y jabalí de Asturias. “Hotspots” y medidas de control. *Revista Tecnología Agroalimentaria*. 23, pp. 51–56.

13. Prieto, J.M., Quirós, P., & Balseiro, A. (2020b). Eficacia de la captura de tejones (*Meles meles*) en el contexto de la investigación de la tuberculosis animal en la España atlántica. *Galemys*. 32. doi: 10.7325/Galemys.2020.A1.
14. Richomme, C., Lesellier, S., Salguero, F.J., Barrat, J.L., Boucher, J.M., Hénault, S., de Cruz, K., Michelet, L., Lyachenko, K., O'Holoran, C., Balseiro, A., & Boschioli, M.L. (2022). Experimental infection of red fox (*Vulpes vulpes*) with a *Mycobacterium bovis* strain naturally virulent. *Microorganisms*. 10, 380. doi: 10.3390/microorganisms10020380.
15. Smith, G.C., Barber, A., Breslin, P., Birch, C., Chambers, M., Davé, D., Hogarth, P., Gormley, E., Lesellier, S., Balseiro, A., & Budgey, R. (2022). Simulating partial vaccine protection: BCG in badgers. *Preventive Veterinary Medicine*. 204, 105635. doi: 10.1016/j.prevetmed.2022.105635.
16. Tanner, E., White, A., Acevedo, P., Balseiro, A., Marcos, J., & Gortázar, C. (2019). Wolves contribute to disease control in a multi-host system. *Scientific Reports*. 9, 7940. doi: 10.1038/s41598-019-44148-9.
17. Thomas, J., Balseiro, A., Gortázar, C., & Risalde, M.A. (2021). Diagnosis of tuberculosis in wildlife: a systematic review. *Veterinary Research*. 52. doi: 10.1186/s13567-020-00881-y.

LIBRO

Balseiro, A., Gortázar, C., Sáez, J.L. (2019). *Tuberculosis animal: una perspectiva desde la Ciencia y la Administración*. Edita MAPA. Depósito Legal: M-25393-2019.

Martínez-Guijosa, J., Acevedo, P., Balseiro, A., García-Bocanegra, I., Sáez-Llorente, J.L., Vicente, J., Gortázar, C. (2021). *Manual para la actuación frente a la tuberculosis en fauna silvestre*. Edita MAPA. Depósito legal: CR 329-2021.

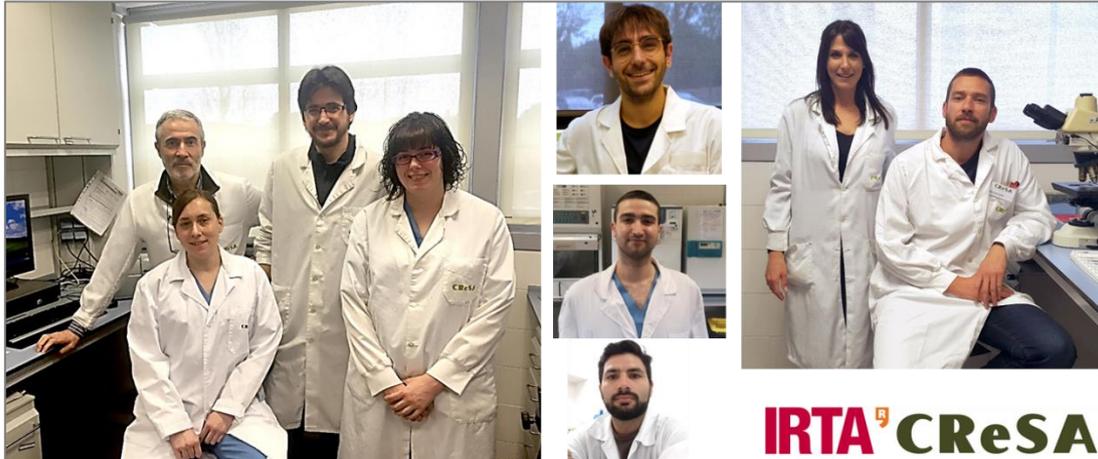
-Volumen 1: Programas de mejora sanitaria en terrenos cinegéticos para el control de la tuberculosis en fauna silvestre. ISBN: 978-84-09-31694-6.

-Volumen 2: Medidas de bioseguridad en explotaciones extensivas de ganado bovino. ISBN: 978-84-09-31650-2.

Proyectos o contratos financiados

1. **Título del proyecto:** Eurasian badgers (*Meles meles*) and animal tuberculosis in Spain: badger-cattle interactions in hotspot areas and means of disease control at the interface (BADTUB), RTI2018-096010-B-C21
Entidad financiadora: Agencia Estatal de Investigación
Duración: 2018-2022
Investigador principal: Ana Balseiro
2. **Título del proyecto:** Proyecto piloto de la mejora de la bioseguridad en ganadería bovina extensiva del Valle de Alcudia, SG-2019-02
Entidad financiadora: Junta de Castilla La Mancha
Duración: 2019-2021
Investigador principal: Christian Gortázar
3. **Título del proyecto:** Ganadería con una sola salud: monitoreo ambiental y mitigación de riesgos para la producción ganadera segura y sostenible y la conservación de la biodiversidad. (PLEC2021-008113)
Entidad financiadora: Agencia Estatal de Investigación
Duración: 2021-2024
Investigador responsable: Christian Gortázar

IRTA-CReSA



Mariano Domingo
Maite Martín
Bernat Pérez de Val
Zoraida Cervera
Álex Cobos

Abel Muñoz
Cristian Melgarejo
Mónica Pérez
Enric Vidal.

Contacto: Bernat Pérez de Val

bernat.perez@irta.cat

<http://www.cresa.cat/blogs/sociedad/es/>

Historia

El grupo de investigación en tuberculosis animal el CReSA (IRTA-CReSA desde 2015) participa en el Programa de erradicación de la tuberculosis (TB) bovina en Cataluña desde 2003 a partir de un marco de colaboración estable con el *Departament d'Acció Climàtica, Alimentació i Agenda Rural* (DACC) de la *Generalitat de Catalunya*. En 2008, se incorpora la vigilancia en mataderos a través del servicio de apoyo a mataderos (SESC) por encargo del *Departament de Salut* de la Generalitat. En 2012, la colaboración con el DACC se extiende al Plan de vigilancia sanitaria de la fauna silvestre en Catalunya y, desde 2014, a planes piloto de control de la TB caprina. Recientemente, el grupo de investigación, con el apoyo del DACC y del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), ha realizado estudios en el campo de **epidemiología molecular** a partir de datos de secuenciación de genoma completo de las muestras obtenidas de los **programas de vigilancia, control y erradicación** de la TB animal.

Adicionalmente, desde 2004, el grupo de investigación participa en proyectos competitivos y contratos de I+D+i investigando la seguridad, inmunogenicidad y eficacia de **vacunas**, el desarrollo y evaluación de herramientas de **diagnóstico**, así como en nuevas aproximaciones para el control de la TB animal y humana. Para ello se ha trabajado con diferentes modelos experimentales (caprino, ovino, bovino, suidos y pequeños roedores) en la Unidad de Alta Biocontención del IRTA-CReSA, que forma parte **Infraestructura Científica y Tecnológica Singular (ICTS) RLASB** (www.rlasb.es). Los estudios fruto de

estos proyectos y colaboraciones del IRTA-CReSA en los programas oficiales ha derivado en diversas publicaciones y comunicaciones científicas.

Avances de la investigación entre 2019-2022

Los estudios realizados por el grupo en este periodo se han llevado a cabo en el marco de proyectos de investigación nacionales (RTA2015-00043-C02-01 y PID2019-105155RB-C32) e internacionales (EFA357/19/INNOTUB, programa Interreg-POCTEFA), o en contratos de I+D+i con empresas, el DACC o el MAPA. Entre los hitos más recientes (Tabla 1) destacan:

- Eficacia de **BCG** frente a la tuberculosis caprina en condiciones de campo, duración inmunidad BCG y eficacia de la revacunación.
- Eficacia de **vacunas inactivadas y autovacunas** en el modelo caprino (Figura 2).

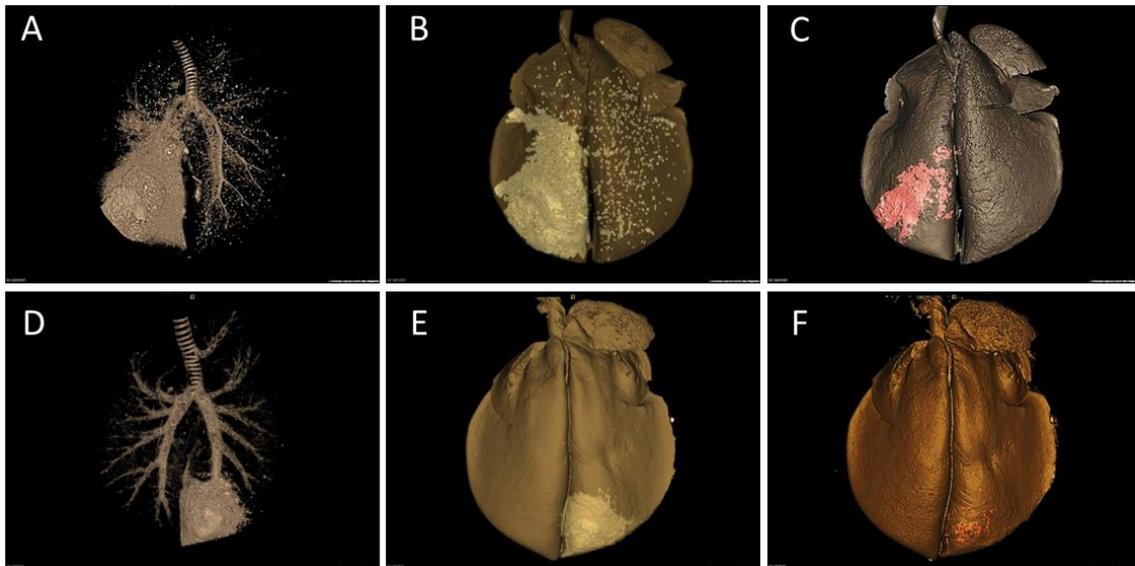


Figura 2. Tomografía Axial Computarizada de pulmones de cabras desafiadas con *M. caprae*. (A-C) Animal control no vacunado. (D-F) Animal inmunizado con un inmunoestimulador basado en *M. bovis* inactivado por calor. (A,B,D,E) Volumen total y distribución de lesiones tuberculosas en blanco respecto al árbol bronquial (A,D) o la imagen renderizada de todo el pulmón (B,E). (C,F) Volumen de mineralización de las lesiones (en rojo). En el pulmón del animal vacunado se observa disminución del volumen de lesiones, así como de su mineralización y de su diseminación intrapulmonar).

- Diagnóstico inmunológico: Evaluación de reactivos para diferenciar animales vacunados e infectados (**DIVA**) en animales vacunados y del complejo **P22** en el inmunodiagnóstico de la TB caprina. Estudio de interferencias por otras micobacterias diferentes a *M. bovis*, *M. caprae* o *M. tuberculosis*.
- Aplicación de la **secuenciación de genoma completo** en la epidemiología molecular de *M. bovis* y *M. caprae* en Catalunya. Estudio filogenético y modelización de la secuencia de eventos de transmisión en brotes de TB. Estudio de mutaciones asociadas a resistencias a antimicrobianos y factores de virulencia.
- Caracterización de la infección de roedores silvestres por *M. microti* (Figura 3).

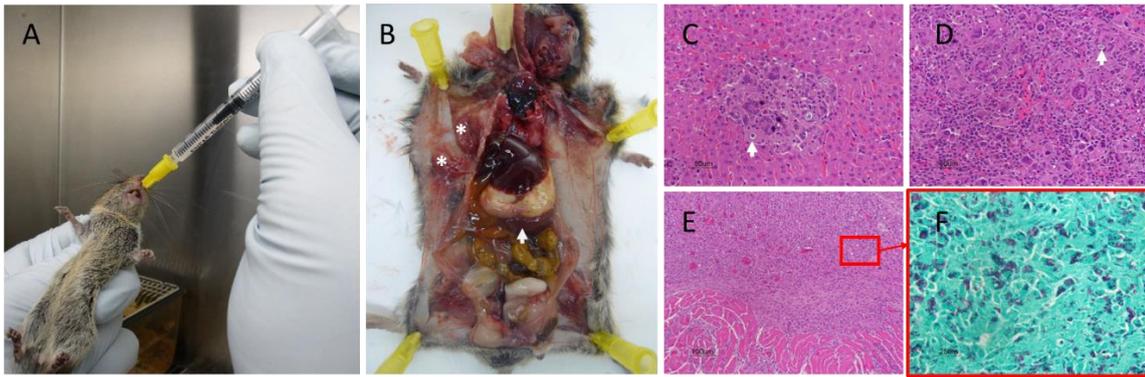


Figura 3. Topillo infectado experimentalmente con *M. microti*. (A) Inoculación intragástrica de *M. microti*. (B) En la necropsia (95dpi) se observan granulomas axilares subcutáneos (asteriscos) y esplenomegalia (flecha). (C-D) Granuloma hepático con presencia de células gigantes multinucleadas y mineralización (flechas). (E-F) Lesión axilar con infiltración en músculo y abundante presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes en la tinción de Ziehl-Neelsen.

Futuro

El grupo seguirá trabajando en los ámbitos en los que actualmente desarrolla su actividad: vacunas e inmunidad, mejora del diagnóstico y aplicación de las herramientas de secuenciación masiva en la epidemiología y la caracterización de las cepas de complejo *M. tuberculosis* (CMTB) circulantes en el contexto ibérico. La aproximación del grupo es la de contribuir al desarrollo de estrategias integrales de control de la TB animal desde una perspectiva multi-hospedador, incluyendo animales domésticos y silvestres. Algunos de los temas a desarrollar, en colaboración con otros grupos de investigación, se resumen en la Tabla 2.

Resumen

Tabla 1. Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB			
Campo	Resultado	Aplicación	Referencias
Control y prevención	Eficacia de BCG frente a la TB bovina y caprina en condiciones de campo, duración inmunidad BCG y eficacia de la revacunación.	Estrategia complementaria de control, disminución de la transmisión y reducción progresiva de la prevalencia en rebaños con elevada afectación de TB.	7,8,13
Control y prevención	Eficacia de vacunas inactivadas y autovacunas en el modelo caprino.	Evaluación de la utilidad de estas vacunas más termoestables y adaptadas a las cepas circulantes para su eventual uso en las especies susceptibles de TB.	2,3
Diagnóstico	Evaluación de reactivos DIVA y del complejo P22 en el inmunodiagnóstico de la tuberculosis caprina.	Mejora del diagnóstico de TB basado en tuberculinas en determinadas situaciones epidemiológicas.	6,8
Epidemiología	Aplicación de la secuenciación de genoma completo (SGC) de las cepas de <i>M. bovis</i> y <i>M. caprae</i> circulantes en Catalunya.	Epidemiología molecular de brotes y estudio de resistencias a antimicrobianos para mejorar la prevención, el control y el análisis de riesgo.	9,10,11,14
Epidemiología/Control	Estudios de brote y experimentales sobre la patogenicidad y transmisión de TB en especies silvestres y pequeños rumiantes.	Estudios de brote, o experimentales con diferentes herramientas diagnósticas y de epidemiología molecular para mejorar el conocimiento de la propagación de la TB y adecuar las medidas de control.	1,5,9,10,11,12,14

Tabla 2. Objetivos inmediatos y su beneficio potencial para el control de TB		
Campo	Objetivo	Beneficio
Epidemiología	Uso de la SGC para la investigación de casos de infección residual y/o brotes con cepas de CMTB reemergentes.	Mejora del conocimiento del origen y la dinámica de los brotes, especialmente los reemergentes en áreas de muy baja prevalencia, con el fin de mejorar la toma de decisiones para su prevención y rápido control.
Diagnóstico	Mejora evaluación del diagnóstico molecular de detección CMTB y micobacterias no tuberculosas.	Mejorar los programas de control y erradicación, agilizando la confirmación de los brotes (reducir la dependencia del cultivo microbiológico) y mejorar la especificidad global del diagnóstico.
Control y prevención	Estudio inmunidad innata/entrenada inducida por inmunoestimulantes, duración de inmunidad tras la revacunación, inmunogenicidad y eficacia de la de vacunas administradas por vía mucosal.	Desarrollar herramientas para el control de la TB animal y aportar nuevos conocimientos para mejorar la evaluación de la eficacia de vacunas y caracterizar su potencial utilidad en condiciones de campo en el marco de programas de control.

Publicaciones derivadas

1. Vidal, E. *et al.* Transmission of tuberculosis caused by *Mycobacterium caprae* between dairy sheep and goats. *Small Ruminant Research* 158, 22–25 (2018).
2. Domingo, M. *et al.* Improved Measurement of Lesions for Assessment of Efficacy of Tuberculosis Vaccines in Small Ruminant Models: From Scoring To Imaging and Volumetric Quantification. *J Comp Pathol* 158, 93 (2018).
3. Arrieta-Villegas, C. *et al.* Efficacy of parenteral vaccination against tuberculosis with heat-inactivated *Mycobacterium bovis* in experimentally challenged goats. *PLoS One* 13, e0196948 (2018).
4. Napp, S. *et al.* Evaluation of the effectiveness of the surveillance system for tuberculosis in cattle in Spain. *Prev Vet Med* 104805 (2019) doi:10.1016/J.PREVETMED.2019.104805.
5. Pérez de Val, B. *et al.* *Mycobacterium microti* Infection in Free-Ranging Wild Boar, Spain, 2017–2019. *Emerg Infect Dis* 25, 2152–2154 (2019).
6. Arrieta-Villegas, C. *et al.* Evaluation of P22 Antigenic Complex for the Immuno-Diagnosis of Tuberculosis in BCG Vaccinated and Unvaccinated Goats. *Front Vet Sci* 7, 1–9 (2020).
7. Arrieta-Villegas, C. *et al.* Long-term efficacy of BCG vaccination in goat herds with a high prevalence of tuberculosis. *Sci Rep* 10, 1–12 (2020).
8. Arrieta-Villegas, C. *et al.* Immunogenicity and protection against *Mycobacterium caprae* challenge in goats vaccinated with BCG and revaccinated after one year. *Vaccines (Basel)* 8, 1–16 (2020).
9. Perea, C. *et al.* Whole-Genome SNP Analysis Identifies Putative *Mycobacterium bovis* Transmission Clusters in Livestock and Wildlife in Catalonia, Spain. *Microorganisms* 2021, Vol. 9, Page 1629 9, 1629 (2021).
10. Pérez de Val, B. *et al.* Polyresistant *Mycobacterium bovis* Infection in Human and Sympatric Sheep, Spain, 2017–2018. *Emerg Infect Dis* 27(4), 1241–1242 (2021).
11. Ciaravino, G. *et al.* Phylogenetic relationships investigation of *Mycobacterium caprae* strains from sympatric wild boar and goats based on whole genome sequencing. *Transbound Emerg Dis* 68, 1476–1486 (2021).
12. Vidal, E. *et al.* Experimental *Mycobacterium microti* Infection in Bank Voles (*Myodes glareolus*). *Microorganisms* 2022, Vol. 10, Page 135 10, 135 (2022).
13. Ábalos, P. *et al.* Vaccination of Calves with the *Mycobacterium bovis* BCG Strain Induces Protection against Bovine Tuberculosis in Dairy Herds under a Natural Transmission Setting. *Animals (Basel)* 12, (2022).
14. Pérez de Val, B. *et al.* Generalized tuberculosis due to *Mycobacterium caprae* in a red fox phylogenetically related to livestock breakdowns. *BMC Vet Res* 18, 352 (2022).

NEIKER – Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario



Contacto: Joseba M. Garrido Urkullu

jgarrido@neiker.eus

Neiker.eus

Historia

NEIKER, Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, es una empresa pública dependiente del Departamento de Desarrollo Económico, Sostenibilidad y Medio Ambiente del Gobierno Vasco. El Departamento de Sanidad Animal de NEIKER está compuesto por un equipo multidisciplinar que centra su trabajo en la investigación y el desarrollo tecnológico de aplicación en los campos del diagnóstico, el control y la epidemiología de las enfermedades que afectan tanto al ganado como a la fauna silvestre. Tanto la tuberculosis (TB) como la paratuberculosis (PTB) han sido dos enfermedades a las que históricamente se les ha dedicado especial atención y esfuerzo en NEIKER. El abordaje científico de ambas en paralelo, teniendo en cuenta su similitud etiológica y que ambas comparten mecanismos de respuesta inmune que son filogenéticamente críticos en la maduración del sistema inmune de los mamíferos, permite el trasvase bidireccional de recursos y conocimientos que hacen más fructífera nuestra labor investigadora.

Como logros históricos, se puede destacar:

- Primer estudio científico de la tuberculosis bovina y primer diagnóstico de la paratuberculosis bovina en España.
- La introducción del concepto de vacuna inactivada frente a la tuberculosis
- La primera demostración de la mejora de la lisis de *M. bovis* ex vivo por vacunación
- El asesoramiento de los ganaderos para la introducción de la vacuna contra la paratuberculosis en Australia en los años 90
- El primer estudio de campo de larga duración de la vacunación contra paratuberculosis en la especie bovina y el análisis de sus efectos no específicos
- Único estudio histopatológico y microbiológico a gran escala de paratuberculosis bovina.

Este trabajo se ha llevado a cabo en estrecha colaboración con diferentes centros de investigación, así como con las distintas administraciones competentes.

Avances de la investigación entre 2019-2022

En este periodo nuestro trabajo se ha enfocado principalmente en:

1. Estudios de la protección de una vacuna homóloga inactivada por calor
2. Búsqueda de nuevos prototipos vacunales que no interfirieran con las técnicas de diagnóstico utilizadas en los programas de erradicación
 - a. Selección de prototipos vacunales mediante ensayos en cobayas
 - b. Cribado de los prototipos seleccionados en base a la protección conferida en ratones desafiados con *M. bovis*.
 - c. Ensayo de los prototipos seleccionados en la especie caprina considerada tanto como especie de destino, como modelo para otras especies.
3. Estudio del papel de los micromamíferos como reservorio de micobacterias en el entorno de las explotaciones ganaderas
4. Desarrollo y optimización de protocolos de PCR a tiempo real para especies de difícil detección como *Mycobacterium microti*
5. Estudio de las posibles interferencias ocasionadas por infecciones no tuberculosas en el diagnóstico de la TB mediante IDR utilizando antígenos convencionales (PPDa y PPD_b) y recombinantes altamente específicos (FP y PC)
6. Estudio de la posible interferencia en el diagnóstico de la TB ocasionada por la infección natural por Map y por la vacuna frente a la paratuberculosis bovina.
7. Estudio de subpoblaciones de linfocitos (CD4, CD44, CD25, $\gamma\delta$) como marcadores de inmunorregulación, memoria e interfase innata y adaptativa
8. Estudio de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) de fagocitos.
9. Desarrollo de técnicas para medir ROS y fagocitosis en sangre entera de neutrófilos y monocitos por citometría de flujo
10. Estudio de la capacidad micobactericida de las células inmunitarias mediante Mycobacterial Growth Inhibition Assay (MGIA)
11. Estudio de la respuesta inmune entrenada producida tras la administración de vacunas de origen micobacteriano en diferentes especies animales
12. Descripción de la diversidad de micobacterias no tuberculosas (MNT) que circulan en especies silvestres y domésticas y evaluar sus posibles implicaciones como patógenos potenciales o como fuente de interferencias en el diagnóstico de TB bovina
13. Estudio a través de fototrampeo de la naturaleza de las interacciones entre ganado y mamíferos silvestres del País Vasco, que podrían jugar un papel en la epidemiología de las micobacteriosis
14. Puesta a punto de un ELISA para el diagnóstico de la tuberculosis leporina
15. Mantenimiento de la vigilancia epidemiológica (microbiología e histopatología) en el marco de los programas de erradicación. En esta línea cabe destacar:
 - a. Participación en la descripción de un foco de TB en un rebaño ovino de la CAPV
 - b. Participación en la descripción de un foco de TB en una granja de conejos de Aragón en colaboración con el Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza
16. Vigilancia epidemiológica de las micobacteriosis en la fauna silvestre

Futuro

Continuar el estudio de diferentes aspectos relacionados con la inmunidad frente a micobacterias tanto para mejorar la tecnología de la vacunación (genética, tiempos, rutas, antígenos, inactivación, dosis, adyuvantes) e identificar otros efectos no-específicos, como pueden ser las interferencias en las pruebas de diagnóstico. Además, se mantendrá la línea de vigilancia epidemiológica para profundizar en la comprensión de los efectos de los factores ambientales en la aparición de nuevos brotes de infección tuberculosa y su control.

Resumen

Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB			
Campo	Resultado	Aplicación	Referencia
Epidemiología	Conocimiento de la prevalencia y distribución de la TB y otras micobacteriosis en ganado doméstico y en fauna silvestre en la CAPV y de las interacciones silvestre-doméstico	Análisis de riesgo de transmisión	5, 6, 14, 17
Diagnóstico	Diseño de nuevos protocolos para el diagnóstico de la tuberculosis animal, PCR a tiempo real y ELISA principalmente	Estudios de prevalencia y confirmación de casos	Mejoras sobre Sevilla <i>et al.</i> , 2015
Diagnóstico	Evaluación de la interferencia de la infección natural con Map y de la vacunación frente a PTB en el diagnóstico de la TB en ganado bovino	Control de la PTB y diagnóstico de la TB bovina	8
Control	Puesta a punto de modelos de TB en jabalí, ciervo y ternero	Prueba de prototipos vacunales: cuantificación de la protección y estudios de interferencia	7, 9, 13
Control	Conocimiento del efecto de una vacuna hecha a partir de M. bovis inactivado por calor en la inmunidad entrenada de los animales	Control de la TB y estimulación del sistema inmunitario frente a otras infecciones	20

Objetivos inmediatos y su beneficio potencial para el control de TB		
Campo	Objetivo	Beneficio
Epidemiología	Monitorizar el estatus sanitario en las poblaciones de ungulados silvestres con relación a la TB en la CAPV	Conocimiento sobre la epidemiología de la TB en fauna silvestre y del riesgo de transmisión entre las poblaciones silvestres y domésticas
Diagnóstico	Caracterización molecular de las cepas de micobacterias	Estudios epidemiológicos y de la virulencia de las cepas
Control	Desarrollo de inmunoestimulantes y búsqueda de alternativas de administración para evitar las interferencias con las pruebas de diagnóstico	Control de la TB tanto en fauna silvestre como en ganado doméstico
Control	Estudio del efecto producido por los antígenos de origen micobacteriano en la inmunidad entrenada	Control de las micobacteriosis y mejora no-específica de la respuesta inmune

Publicaciones derivadas

1. Jobin Thomas, Jose A. Infantes-Lorenzo, Inmaculada Moreno, Beatriz Romero, Alba Fresco-Taboada, Joseba Garrido, Ramón Juste, Mercedes Domínguez, Paloma Rueda, Lucas Domínguez, Christian Gortazar, María A. Risalde. A new test to detect antibodies against *Mycobacterium tuberculosis* complex in red deer serum. *The Veterinary Journal* 244 (2019) 98–103
2. Ainhoa Palacios, Leticia Sampedro, Iker Sevilla, Elena Molina, David Gil, Mikel Azkargorta, Felix Elortza, Joseba Garrido, Juan Anguita and Rafael Prados-Rosales. *Mycobacterium tuberculosis* extracellular vesicle-associated lipoprotein, LpqH has biomarker capacity between paratuberculosis and bovine tuberculosis. *BMC Vet Res.* 2019 Jun 7;15(1):188. doi: 10.1186/s12917-019-1941-6.
3. Iratxe Díez-Delgado, Iker A. Sevilla, Joseba M. Garrido, Beatriz Romero, María V. Geijo, Lucas Domínguez, Ramón A. Juste, Alicia Aranaz, José de la Fuente, Christian Gortazar. Tuberculosis vaccination sequence effect on protection in wild boar. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 66 (2019) 101321
4. Iker A. Sevilla, Daniel Fernández de Luco, Miguel Fuertes, Jesús Comenge, Elvira Martín, Mari Cruz Arnal, Natalia Elguezabal, Joseba M. Garrido. Tuberculosis outbreak caused by *Mycobacterium caprae* in a rabbit farm in Spain. *Transbound Emerg Dis.* 2020 Jan;67(1):431-441. doi: 10.1111/tbed.13366
5. Varela-Castro V, Álvarez V, Sevilla IA, Barral M. Risk factors associated to a high *Mycobacterium tuberculosis* complex seroprevalence in wild boar (*Sus scrofa*) from a low bovine tuberculosis prevalence area. 2020. *PLoS One*, 15(4): e0231559
6. Varela-Castro V, Álvarez V, Sevilla IA, Barral M. Detection of Wood Mice (*Apodemus sylvaticus*) Carrying Non-Tuberculous Mycobacteria Able to Infect Cattle and Interfere with the Diagnosis of Bovine Tuberculosis. 2020. *Microorganisms*, 8(3):374
7. Balseiro A, Prieto JM, Álvarez V, Lesellier S, Davé D, Salguero FJ, Sevilla IA, Infantes-Lorenzo JA, Garrido JM, Adriaensen H, Juste RA, Barral M. Protective Effect of Oral BCG and Inactivated *Mycobacterium bovis* Vaccines in European Badgers (*Meles meles*) Experimentally Infected With *M. bovis*. *Front Vet Sci.* 2020 Feb 4;7:41. doi: 10.3389/fvets.2020.00041. eCollection 2020
8. Rakel Arrazuria, Iraia Ladero, Elena Molina, Miguel Fuertes, Ramón Juste, Miguel Fernández, Valentín Pérez, Joseba Garrido and Natalia Elguezabal. Alternative Vaccination Routes against Paratuberculosis Modulate Local Immune Response and Interference with Tuberculosis Diagnosis in Laboratory Animal Models. *Vet. Sci.* 2020, 7, 7; doi:10.3390/vetsci7010007.
9. Vázquez, C.B., Prieto, M., Barral, M., Juste, R.A., Lesellier, S., Salguero, F.J., Davé, D., Martínez, I.Z., García, M.G.G., Casais, R., Balseiro, A. Local lung immune response to *Mycobacterium bovis* challenge after BCG and *M. bovis* heat-inactivated vaccination in European Badger (*Meles meles*). (2020) *Pathogens*, 9 (6), art. no. 456, pp. 1-16.
10. Nol, P., Wehtje, M.E., Bowen, R.A., 20Robbe-Austerman, S., Thacker, T.C., Lantz, K., Rhyan, J.C., Baeten, L.A., Juste, R.A., Sevilla, I.A., Gortázar, C., Vicente, J. Effects of inactivated *Mycobacterium bovis* vaccination on molokai-origin wild pigs experimentally infected with virulent *M. Bovis* (2020) *Pathogens*, 9 (3), art. no. 199.
11. Francesca Boldrin, Itxaso Anso, Sogol Alebouyeh, Iker Sevilla, Marivi Geijo, Joseba Garrido, Alberto Marina, Laura Cioetto Mazzabò, Greta Segafreddo, Marcelo Guerin, Riccardo Manganelli, and Rafael Prados-Rosales. The phosphatidyl-myo-inositol dimannoside acyltransferase PatA is essential for *Mycobacterium tuberculosis* growth in vitro and in vivo. *J Bacteriol.* 2021 Jan 19;JB.00439-20. doi: 10.1128/JB.00439-20.
12. Ruiz-Cabello J, Sevilla I.A., Olaizola E., Bezos J., Miguel-Coello A.B., Muñoz-Mendoza M., Beraza M., Garrido J.M., Izquierdo-García J.L. Benchtop Nuclear Magnetic Resonance-based metabolomic approach for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Transboundary and Emerging Diseases* (2021) doi: 10.1111/tbed.14365

13. Vázquez, C.B., Barral, T.D., Romero, B., Queipo, M., Merediz, I., Quirós, P., Armenteros, J.Á., Juste, R., Domínguez, L., Domínguez, M., Casais, R., Balseiro, A. Spatial and temporal distribution of *Mycobacterium tuberculosis* complex infection in eurasian badger (*Meles meles*) and cattle in Asturias, Spain. (2021) *Animals*, 11 (5), art. no. 1294
14. Varela-Castro V, Gerrikagoitia X, Álvarez V, Geijo M, Barral M, Sevilla IA. A long-term survey on *Mycobacterium tuberculosis* complex in wild mammals from a bovine tuberculosis low prevalence area. 2021. *Eur J Wildl Dis*, 67:Art. #43
15. María Ximena Cuerda, María Alejandra Colombatti, María Jose Gravisaco, Jimena Marfil, Soledad Barandiaran, Iker A Sevilla, Joseba M Garrido, Roberto Damián Moyano, Martín José Zumarraga, María Isabel Romano, Ramón A Juste, María P Santangelo. Pathogenesis and immune response of domestic pigs submitted to mycobacterial sensitizations previous to experimental infection with *Mycobacterium bovis*. *Spanish Journal of Agricultural Research* 20 (1) : e0502 (Marzo 2022)
16. Paul D. Kasaija, Marinela Contreras, Fredrick Kabi, Swidiq Mugerwa, Joseba M. Garrido, Christian Gortazar and José de la Fuente. Oral vaccine formulation combining tick Subolesin with heat inactivated mycobacteria provides control of cross-species cattle tick infestations-Vaccine (2022).
17. Lucía Varela-Castro, Marta Barral, María Cruz Arnal, Daniel Fernández de Luco, Christian Gortázar, Joseba M. Garrido, Iker A. Sevilla. Beyond tuberculosis: Diversity and implications of non-tuberculous mycobacteria at the wildlife–livestock interface. *Transboundary and Emerging Disease* (2022).
18. Javier Ortega Martín, Lucía de Juan, Iker A. Sevilla, Joseba M. Garrido, Álvaro Roy, Carlos Velasco, Beatriz Romero, María M. Dominguez, Bernat Pérez de Val, Carolina Nebot, José Luis Sáez-Llorente, Julio Alvarez and Javier Bezos. Effect of a recent parenteral dexamethasone and ketoprofen administration on the immunological diagnosis of tuberculosis in goats. *Front. Vet. Sci.*(2022). doi: 10.3389/fvets.2022.1042428
19. Nuno Santos, Elisa Ferreras Colino, María Cruz Arnal, Daniel Fernández de Luco, Iker Sevilla, Joseba M. Garrido, Eliana Fonseca, Ana M. Valente, Ana Balseiro, João Queirós, Virgílio Almeida, Joaquín Vicente, Christian Gortázar, Paulo Célio Alves. Complementary roles of wild boar and red deer to animal tuberculosis maintenance in multi-host communities. *Epidemics* Volume 41, December 2022, 100633
20. Juste, R.A., Ferreras-Colino, E., de la Fuente, J., Domínguez, M., Risalde, M.A., Domínguez, L., Cabezas-Cruz, A., Gortázar, C. Heat inactivated mycobacteria, alpha-Gal and zebrafish: Insights gained from experiences with two promising trained immunity inductors and a validated animal model. (2022) *Immunology*, 2022 Oct;167(2):139-153.

Proyectos o contratos financiados

- Título del proyecto:** Desarrollo de prototipos de vacunas inactivadas para el control de la tuberculosis en animales domésticos y evaluación de la interferencia causada por organismos no tuberculosos en su diagnóstico
Entidad financiadora: MINECO
Duración: 2020-2023
Investigador responsable: NEIKER, Iker A. Sevilla. Coordinador, Javier Bezos/Lucía de Juan
- Título del proyecto:** Red transpirenaica de investigación y desarrollo de herramientas innovadoras para el control de la tuberculosis animal
Entidad financiadora: UE. (INTERREG POCTEFA)
Duración: 2020-2022
Investigador responsable: NEIKER, Iker A. Sevilla. Coordinador, Bernat Perez de Val
- Título del proyecto:** El tejón (*Meles meles*) y la tuberculosis animal en España: interacción tejón-bovino en hotspot áreas y medidas de control de la enfermedad en la interfase
Entidad financiadora: MINECO
Duración: 2018-2021
Investigador responsable: NEIKER, Marta Barral. Coordinador, Ana Balseiro
- Título del proyecto:** Control de la paratuberculosis y otras patologías mediante nuevos inmunógenos: protección, diagnóstico DIVA e interferencia con la tuberculosis
Entidad financiadora: INIA
Duración: 2018-2020
Investigador principal: Natalia Elguezabal
- Título del contrato:** Estimation of performance characteristics for *Mycobacterium avium paratuberculosis* (Map) detection methods in dairy products (DUND-101721 ParaTB)
Entidad financiadora: Nestlé (Nestec)
Duración: 2017-2018
Investigador responsable: Iker Agirregomokorta Sevilla

Grupo de investigación: Sanidad y Biotecnología (SaBio) del IREC Universidad de Castilla – La Mancha y CSIC



Miembros del grupo de investigación: 50 miembros, incluyendo 14 IPs, de los que varios estamos especialmente implicados en investigación sobre TB:

Pelayo Acevedo
Christian Gortázar
José de la Fuente

Francisco Ruiz-Fons
Joaquín Vicente
Margarita Villar

Contacto: Christian Gortázar

Christian.Gortazar@uclm.es

www.irec.es

Historia

SaBio contribuye a la salud, la producción animal y la conservación a través de la investigación, el desarrollo tecnológico y la formación especializada. El grupo SaBio pertenece al IREC (www.IREC.es), uno de los principales referentes europeos en la investigación transdisciplinar entre ecología y sanidad animal. La actividad investigadora de SaBio y del IREC, que en 2019 celebró sus primeros 20 años, ha contribuido a que la Universidad de Castilla – La Mancha figure desde 2018 entre las 50 mejores universidades del mundo en el área de ciencias veterinarias. En relación con TB, las dos principales líneas de trabajo se centran en la epidemiología y el control de las infecciones compartidas con la fauna silvestre, así como en el desarrollo de vacunas. SaBio es además un referente en gestión y en monitorización integrada de fauna silvestre, liderando el consorcio europeo EnetWild (<https://enetwild.com/>) y ha creado la Spin-Off Sabiotec.

Avances de la investigación entre 2019-2022

Un tercio de la producción científica reciente del grupo SaBio está relacionado con TB. En epidemiología se ha avanzado en la comprensión de los sistemas multi-hospedador, propensos al mantenimiento del Complejo *M. tuberculosis* (CMT) a lo largo del tiempo (Refs. 1-3). Además, se ha abordado el problema de la sobreabundancia de ungulados silvestres y sus implicaciones para la sanidad animal. El trabajo más citado alude al impacto de COVID-19 sobre la sanidad animal (Ref. 16).

En el campo del diagnóstico se han validado pruebas en numerosas especies silvestres (revisado en Ref. 6) y domésticas. En colaboración con VISAVET y el ISCIII describimos y aplicamos con éxito una nueva forma de muestreo ambiental de ADN del CMT. Se trata de esponjas impregnadas con un líquido que preserva los ácidos nucleicos al tiempo que inactiva los patógenos y facilita el transporte seguro de las muestras al laboratorio (Ref. 5). Esta técnica se está adaptando para la vigilancia ambiental de otros patógenos, incluyendo virus ARN.

Los mayores avances se están produciendo en el campo del control sanitario en la interfaz fauna-ganado. Los nuevos protocolos de bioseguridad, desarrollados en colaboración con GISAZ y VISAVET, entre otros, son aplicables al porcino extensivo (Ref. 7) y al bovino (Ref. 8), y suponen avances significativos en mitigación de riesgos. La investigación sobre inmunización tiene lugar en colaboración con VISAVET, NEIKER y Sabiotec, entre otros. Esto incluye ensayos con micobacterias inactivadas y otros inmunoestimulantes específicos e inespecíficos en fauna silvestre (Ref. 10), bovinos (Ref. 11) o modelos de laboratorio (Refs. 12-15).

Futuro

Un proyecto de transición ecológica abordará el efecto de los cambios de uso del suelo sobre las comunidades bióticas y los patógenos. Este proyecto es una colaboración entre SaBio y GISAZ. Otros proyectos y contratos, como el consorcio EnetWild, inciden en la monitorización poblacional y sanitaria de la fauna silvestre. Paralelamente, se desarrollan iniciativas muy diversas sobre inmunidad y vacunación, bioseguridad en ganadería, epidemiología y diagnóstico. Entre las líneas a desarrollar en colaboración con otros grupos de investigación se incluyen:

Epidemiología

- Desarrollo de mejores técnicas de estima de abundancia de fauna silvestre, aplicables a la vigilancia sanitaria y al control de la TB.
- Análisis y seguimiento de comunidades complejas de hospedadores y de patógenos para identificar nuevas formas de monitorización y control de las infecciones compartidas con la fauna silvestre.

Diagnóstico

- Detección de ácidos nucleicos de múltiples patógenos y múltiples hospedadores en muestras ambientales como agua, suelo, aire y superficies y su aplicación a la vigilancia sanitaria y a la bioseguridad en ganadería.

Control

- Refinamiento y ampliación a nuevas especies ganaderas y diversas situaciones sanitarias de los protocolos de bioseguridad aplicables a la interfaz fauna-ganado.
- Colaboraciones internacionales y con empresas en estudios sobre la respuesta a la vacunación con micobacterias inactivadas y productos afines en diversas especies domésticas y silvestres.

Resumen

Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB			
Campo	Resultado	Aplicación	Referencia
Epidemiología	La riqueza de hospedadores aumenta la probabilidad de que el complejo CMT se mantenga a lo largo del tiempo.	Diseñar medidas de actuación que abarquen a todos los hospedadores implicados en cada situación.	1
	En Europa existen más animales no bovinos infectados, que bovinos. Esto ocurre independientemente del país o zona geográfica, incluso en regiones oficialmente libres.	Diseñar medidas de control de TB en especies no bovinas. El PATUBES español constituye un ejemplo en este sentido.	2
Control	Nuevos protocolos de bioseguridad en ganadería extensiva bovina y porcina.	Aplicar medidas de bioseguridad permite reducir significativamente los riesgos de TB.	7, 8
	El control de hospedadores clave (ejemplo jabalí) ayuda a reducir la incidencia de tuberculosis bovina.	Favorecer medidas que incrementen el control de especies problema como el jabalí, por ejemplo, mediante la caza.	3, 9
	Protección específica e inespecífica a partir de inmunoestimulantes (inmunidad entrenada) parenterales u orales.	Nuevas vacunas y estrategias de control de la TB y otras enfermedades.	10, 11, 12, 13, 14, 15

Objetivos inmediatos y su beneficio potencial para el control de TB		
Campo	Objetivo	Beneficio
Epidemiología	Monitorizar las poblaciones de fauna silvestre, cuantificar sus interacciones con las especies ganaderas, y monitorizar el estatus sanitario de ambas en cuanto a TB y otras.	Avanzar hacia una monitorización integrada: fauna + ganado // poblaciones + enfermedad.
Epidemiología	Conocer los mecanismos de mantenimiento y transmisión de CMT en comunidades complejas.	Identificar nuevas medidas de control.
Diagnóstico	Desarrollo de la detección de ácidos nucleicos ambientales en la vigilancia de TB y otros patógenos, así como para la caracterización de las comunidades de hospedadores.	Desarrollo de tecnologías capaces de detectar CMT en diversas matrices, aplicables a la supervisión de las medidas de bioseguridad, los análisis de riesgos, y la monitorización.
Control	Estudios sobre la interferencia de la vacunación con el diagnóstico de la tuberculosis.	Desarrollo de vacunas y pautas de vacunación que no interfieran con el diagnóstico in vivo de la tuberculosis.
Control	Colaboraciones público-privadas para el desarrollo de nuevas vacunas e inmunoestimulantes, capaces de ofrecer protección específica y/o inespecífica frente a diversos patógenos incluido MTC.	Nuevas vacunas e inmunoestimulantes.

Publicaciones derivadas

Selección de artículos publicados por SaBio en colaboración con numerosos grupos nacionales e internacionales. La búsqueda en Scopus (AF-ID ("SaBio Spain" 60106239)) AND (tuberculosis) AND (LIMIT-TO (PUBYEAR, 2022) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2021) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2020) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2019) OR LIMIT-TO (PUBYEAR, 2018)) da lugar a 100 documentos, de los que hemos seleccionado los 16 más representativos.

Epidemiología

1. Barasona, J.A., Gortázar, C., de la Fuente, J., Vicente, J. 2019. Host richness increases tuberculosis disease risk in game-managed areas. *Microorganisms* 7(6),182.
2. Santos, N., Richomme, C., Nunes, T., (...), Delahay, R., Gortázar, C. 2020. Quantification of the animal tuberculosis multi- host community offers insights for control. *Pathogens* 9(6),421.
3. Tanner, E., White, A., Acevedo, P., (...), Marcos, J., Gortázar, C. 2019. Wolves contribute to disease control in a multi-host system. *Scientific Reports* 9(1),7940.

Diagnóstico

4. Lyashchenko, K.P., Gortázar, C., Miller, M.A., Waters, W.R. 2018. Spectrum of antibody profiles in tuberculous elephants, cervids, and cattle. *Veterinary Microbiology* 214, pp. 89-92.
5. Martínez-Guijosa, J., Romero, B., Infantes-Lorenzo, J.A., (...), Domínguez, L., Gortázar, C. 2020. Environmental DNA: A promising factor for tuberculosis risk assessment in multi-host settings. *PLoS ONE* 15(5),e0233837.
6. Thomas, J., Balseiro, A., Gortázar, C., Rivalde, M.A. 2021. Diagnosis of tuberculosis in wildlife: a systematic review. *Veterinary Research* 52(1),31.

Control

Bioseguridad

7. Jiménez-Ruiz, S., Laguna, E., Vicente, J., (...), Rivalde, M.A., Acevedo, P. 2022. Characterization and management of interaction risks between livestock and wild ungulates on outdoor pig farms in Spain. *Porcine Health Management* 8(1),2.
8. Martínez-Guijosa, J., Lima-Barbero, J.F., Acevedo, P., (...), Gortázar, C., Vicente, J. 2021. Description and implementation of an On-farm Wildlife Risk Mitigation Protocol at the wildlife-livestock interface: Tuberculosis in Mediterranean environments. *Preventive Veterinary Medicine* 191,105346.

Control poblacional

9. Tanner, E., White, A., Lurz, P.W.W., (...), Díez-Delgado, I., Boots, M. (2019). The critical role of infectious disease in compensatory population growth in response to culling. *American Naturalist* 194(1), pp. E1-E12.

Vacunación

10. Díez-Delgado, I., Sevilla, I.A., Romero, B., (...), Aranz, A., Gortazar, C. 2018. Impact of piglet oral vaccination against tuberculosis in endemic free-ranging wild boar populations. *Preventive Veterinary Medicine* 155, pp. 11-20.
11. Kasaija, P.D., Contreras, M., Kabi, F., (...), Gortazar, C., de la Fuente, J. 2022. Oral vaccine formulation combining tick Subolesin with heat inactivated mycobacteria provides control of cross-species cattle tick infestations. *Vaccine* 40(32), pp. 4564-4573.
12. López, V., Rivalde, M.A., Contreras, M., (...), Gortázar, C., de la Fuente, J. 2018. Heat-inactivated *Mycobacterium bovis* protects zebrafish against mycobacteriosis. *Journal of Fish Diseases* 41(10), pp. 1515-1528.

13. Pacheco, I., Contreras, M., Villar, M., (...), Gortázar, C., De La Fuente, J. 2020. Vaccination with alpha-gal protects against mycobacterial infection in the zebrafish model of tuberculosis. *Vaccines* 8(2),195.
14. Pacheco, I., Díaz-Sánchez, S., Contreras, M., (...), Gortázar, C., de la Fuente, J. 2021. Probiotic bacteria with high alpha-gal content protect zebrafish against mycobacteriosis. *Pharmaceuticals* 14(7),635.
15. Rivalde, M.A., López, V., Contreras, M., (...), Gortázar, C., de la Fuente, J. 2018. Control of mycobacteriosis in zebrafish (*Danio rerio*) mucosally vaccinated with heat-inactivated *Mycobacterium bovis*. *Vaccine* 36(30), pp. 4447-4453.

Otros

16. Gortázar, C., de la Fuente, J. 2020. COVID-19 is likely to impact animal health. *Preventive Veterinary Medicine* 180,105030.

Proyectos o contratos financiados

1. **Título del proyecto:** Claves socio-ecológicas del efecto del cambio en los usos del suelo en las comunidades de hospedadores de patógenos en el marco de la inmunidad del paisaje. (SE-LANDINM)
Entidad financiadora: MICIN/ TED2021-132599B-C21
Duración: 2022-2023
Investigador responsable: Acevedo, P., Ruiz Fons, J.F.
2. **Título del proyecto:** Ganadería con una sola salud: monitoreo ambiental y mitigación de riesgos para la producción ganadera segura y sostenible y la conservación de la biodiversidad. (PLEC2021-008113)
Entidad financiadora: MICIN/AEI/10.13039/501100011033 y por la Unión Europea NextGenerationEU/PRTR
Duración: 2021-2024
Investigador responsable: Christian Gortázar
3. **Título del proyecto:** Armonización de los datos poblacionales de la fauna silvestre en España: aplicaciones a la vigilancia sanitaria y control de enfermedades compartidas con el ganado. PID2019-111699RB-I00.
Entidad financiadora: Plan Nacional de Investigación (Retos).
Duración: 2020-2023
Investigador responsable: Vicente, J, Acevedo, P.
4. **Título del proyecto:** Inmunidad inespecífica asociada a micobacterias inactivadas: rango de patógenos, especificidad del inmunógeno y mecanismos moleculares implicados. MYCOTRAINING. SBPLY/19/180501/000174.
Entidad financiadora: Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha.
Duración: 2020-2023
Investigador responsable: Gortázar C, Rivalde MA.

IUSA-ONEHEALTH 3



Marisa Ana Andrada Borzollino
Antonio Fernández Rodríguez
Antonio Espinosa de los Monteros
y Zayas

Pedro Herráez Thomas
Miguel Antonio Rivero Santana
Óscar Quesada Canales
Yania Paz Sánchez
Elena Plamenova

Contacto: Marisa Ana Andrada Borzollino

marisaana.andrada@ulpgc.es

<http://www.iusa.eu/>

Historia

El grupo IUSA-ONEHEALTH 3: Histología y Patología Veterinaria y Forense (Terrestre y Marina) (HAP-VET) del Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria de la Universidad de Las Palmas de Gran Canaria (IUSA-ULPGC) está constituido por un equipo multidisciplinar de investigadores e investigadoras con 11 líneas de investigación. Una de las líneas de investigación desde el 2005 hasta la fecha, tiene como objetivo principal la investigación, desarrollo e innovación; así como la prestación de servicios y la transferencia de conocimientos en el ámbito del Plan Nacional de Control y erradicación de la Tuberculosis (TB) bovina en el archipiélago canario. El IUSA, mediante convenios con la Dirección General de Ganadería de la Comunidad Autónoma, participa en el estudio anatomopatológico de animales positivos y dudosos a la prueba de intradermotuberculinización (IDTB), en el marco de lucha contra las enfermedades producidas por el Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), teniendo en cuenta la normativa aplicable a los diferentes niveles administrativos: autonómico, nacional, comunitario e internacional.

La Comunidad Autónoma de Canarias, fue incluida en el Capítulo 2 del Anexo I de la referida Decisión 2003/467/CE como región oficialmente indemne de tuberculosis bovina, mediante la Decisión de Ejecución (UE) 2017/252, de la Comisión, de 9 de febrero de 2017, por la que se modifica el Anexo II de la Decisión 93/52/CEE y por la que se modifican los anexos de la Decisión 2003/467/CE.

Desde la adquisición del estatuto sanitario de indemne frente a la TB de la comunidad autónoma continuamos participando como miembros del Programa de Vigilancia Activa de la Tuberculosis Bovina.

Avances de la investigación entre 2019-2022

Un componente fundamental del programa de erradicación es el sistema de vigilancia de la enfermedad en los mataderos, ya que contribuye a detectar rápidamente animales potencialmente infectados no detectados por el sistema de vigilancia en campo. Esta acción se realiza con la Dirección General de Ganadería, quien coordina los protocolos internos y de cooperación entre los Servicios Veterinarios Oficiales de sanidad animal y seguridad alimentaria, que incluyen los mecanismos necesarios para asegurar la comunicación en la forma y plazos establecidos descritos en el protocolo de vigilancia en matadero, aplicando los procedimientos de los manuales [de toma de muestras](#), y [de estudios histopatológicos](#) y su interpretación en el diagnóstico de la TB.

En la Comunidad Autónoma de Canarias de la población bovina censada y sometida a la prueba oficial de la IDTB, durante los años 2019 (92,6%; 17976/19408); 2020 (79,7%; 17358/21784) y 2021 (83,3%; 17943/21546) se han evaluado 103 animales PPD positivos (41; 39,8%) y dudosos (62; 60,2%), correspondiéndose con 26 (2019), 50 (2020) y 27 (2021). La edad de los animales analizados varió entre 6 meses y 15 años (Mediana: 48 meses); perteneciendo a 9 razas, representadas principalmente por: Holstein-Frisona (38,2%), Frisona Europea (24,7%), Mestizo (22,5%); y en mayor proporción hembras (77; 86,5%) que machos (12; 13,5). También se analizaron muestras de caprinos que conviven con bovinos. En la inspección macroscópica, los linfonodos (Ln) (Mesentéricos, [Ms], Retrofaríngeos [Rf], Preescapular [Pe] y Mediastínicos [Md]) presentaron linfadenomegalia, linfadenitis purulenta y linfadenitis granulomatosa, en animales PPD positivos y dudoso. Destacando que en más del 90% de los Ln y en el 100% de las Válvulas ileocecal (Vic) no se observaron lesiones macroscópicas (Tabla 1). En el estudio histológico de 497 muestras analizadas (Ln y Vic) se identificaron microgranulomas (Grado I), que macroscópicamente no son detectables, en LnMs (36,3%; 22,6%), LnRf (9,8%; 0%) LnPe (19,5%; 19,4%), LnMd (4,9%; 1,6%) y Vic (2,6%; 4,3%) en animales PPD positivo y dudosos respectivamente. Linfadenitis granulomatosa (Grado IV), se observaron en LnMs (2,4%; 4,8%), LnRf (9,8%; 0%) LnPe (7,3%; 3,2%), LnMd (9,8%; 0%) en animales PPD positivo y dudosos respectivamente (Tabla 1). Del total de animales analizados (103) y de las muestras remitidas al VISAVET, se identificó *Mycobacterium bovis* (2/103; 1,9%), *Mycobacterium caprae* (2/103; 1,9%) y *Mycobacterium spp* (5/103; 4,9%). Los aislamientos de 3 de los *Mycobacterium*, que pertenecen al grupo CMT, se correspondieron con animales con linfadenitis granulomatosa en LnMd y LnRf; destacando que, en el caso restante, las lesiones solamente fueron visibles mediante el estudio histopatológico. En relación a los aislamientos de *Mycobacterium spp.*, las lesiones observadas en los animales fueron: microgranulomas, localizados en LnMs (1) y en LnPe (1), e hiperplasias reactivas linfoides (HRL) generalizadas (3).

Futuro

- Continuar con el estudio de vigilancia activa de la TB bovina en los mataderos, así como el seguimiento de explotaciones que decidan vacunar frente a la Paratuberculosis caprina, de acuerdo al protocolo aprobado en Consejo de Gobierno de la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Aguas del Gobierno de Canarias, y publicado el 3 de mayo de 2018, en el Boletín Oficial de Canarias (BOC) que permite que el sector ganadero canario pueda vacunar a sus animales frente a esta enfermedad.
- Valorar un anticuerpo policlonal frente a *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* mediante la técnica de inmunohistoquímica, en cortes de tejidos embebidos en parafina, que previamente tuvieron aislamiento frente a *Mycobacterium spp*; *Mycobacterium bovis*, y *Mycobacterium caprae*.
- Poner a punto la técnica de PCR Real time frente a *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis* con fines de diagnóstico diferencial frente a la TB.

Linfonodos			Lesiones microscópicas					TOTAL n (%)
			Sin lesiones n (%)	HRL n (%)	Absceso n (%)	Micro- granuloma n (%) *	Linfoadenitis granulomatosa n (%) **	
PPD (+)	Les. macro	Sin lesiones	14 (34,1%)	11 (26,8%)	-	15 (36,6%)	-	40 (97,6%)
		Linfoadenitis purulenta	-	-	-	-	1 (2,4%)	1 (2,4%)
Ms	PPD dud.	Sin lesiones	11 (17,7%)	31 (50,5%)	-	14 (22,6%)	3 (4,8%)	59 (95,2%)
		Linfoadenomegalia	-	3 (4,8%)	-	-	-	3 (4,8%)
Total			25 (24,3%)	45 (43,7%)	-	29 (28,2%)	4 (3,9%)	103 (100%)
PPD (+)	Les. macro	Sin lesiones	21 (51,2%)	12 (29,3%)	-	4 (9,8%)	1 (2,4%)	38 (92,7%)
		Linfoadenitis purulenta	-	-	-	-	1 (2,4%)	1 (2,4%)
		Linfoadenitis granulomatosa	-	-	-	-	2 (4,9%)	2 (4,9%)
Rf	PPD dud.	Sin lesiones	24 (38,7%)	32 (51,6%)	-	-	-	56 (90,3%)
		Linfoadenomegalia	-	3 (4,8%)	-	-	-	3 (4,8%)
		Linfoadenitis purulenta	-	-	3 (4,8%)	-	-	3 (4,8%)
Total			45 (43,7%)	47 (45,6%)	3 (2,9%)	4 (3,9%)	4 (3,9%)	103 (100%)
PPD (+)	Les. macro	Sin lesiones	18 (43,9%)	12 (29,3%)	-	7 (17,1%)	3 (7,3%)	40 (97,6%)
		Linfoadenomegalia	-	-	-	1 (2,4%)	-	1 (2,4%)
Pe	PPD dud.	Sin lesiones	13 (21,0%)	32 (51,6%)	-	12 (19,4%)	2 (3,2%)	59 (95,2%)
		Linfoadenomegalia	-	3 (4,8%)	-	-	-	3 (4,8%)
Total			31 (30,1%)	47 (45,6%)	-	20 (19,4%)	5 (4,9%)	103 (100%)
PPD (+)	Les. macro	Sin lesiones	22 (53,7%)	11 (26,8%)	-	2 (4,9%)	2 (4,9%)	37 (90,2%)
		Linfoadenitis purulenta	-	-	1 (2,4%)	-	-	1 (2,4%)
		Linfoadenitis granulomatosa	1 (2,4%)	-	-	-	2 (4,9%)	3 (7,3%)
Md	PPD dud.	Sin lesiones	23 (37,1%)	34 (54,8%)	-	1 (1,6%)	-	58 (93,5%)
		Linfoadenomegalia	-	3 (4,8%)	-	-	-	3 (4,8%)
		Linfoadenitis purulenta	-	-	1 (1,6%)	-	-	1 (1,6%)
Total			46 (44,7%)	48 (46,6%)	2 (1,9%)	3 (2,9%)	4 (3,9%)	103 (100%)

Tabla 1: Frecuencia de lesiones macroscópicas (Les. macro) y microscópicas observadas en Lns (Ms, Rf, Pe y Md) de bovinos (95,1%; 98/103) y pequeños rumiantes (4,9%; 5/103), PPD positivos (+) y dudosos (dud.). *lesiones Grado I, **lesiones Grado IV según Wangoo et al., 2005.

Resumen

Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB			
Campo	Resultado	Aplicación	Referencia
Diagnóstico	Diagnóstico Anatomopatológico en bovinos y pequeños rumiantes IDT + o dudosos 2019-2021. Un total de 103 animales IDT+ o dudoso muestreados en matadero (98 bovinos y 5 caprinos), macroscópicamente con o sin lesiones granulomatosas en uno o más Ln y/o Vic. Mediante el estudio histológico y aplicando la clasificación recomendada por MAPA se incrementó el diagnóstico de lesiones compatibles con TB, al detectarse histológicamente microgranulomas (grado I) y granulomas (grado IV).	El estudio microscópico permitió mejorar el diagnóstico de TB en bovinos y pequeños rumiantes y los diagnósticos diferenciales en relación a las lesiones piogranulomatosas que se observan en matadero, así como evidenciar los microgranulomas o granuloma tipo I, como describe (Wangoo, 2005) y que se propone en el Manual para la realización de estudios histopatológicos, inmunohistoquímicos y de PCR directa de tejidos para el diagnóstico rápido de la tuberculosis bovina por el complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (CMT) Programa Nacional de Erradicación de la Tuberculosis Bovina (Infección por el Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>) 2021.	Informes anuales a la DGG del Gobierno de Canarias 2019, 2020 y 2021.

Objetivos inmediatos y su beneficio potencial para el control de TB		
Campo	Objetivo	Beneficio
Diagnóstico	Continuar participando el Programa de Vigilancia Activa de la TB bovina para monitorizar el estatus sanitario en las poblaciones de bovinos y pequeños rumiantes con relación a la TB. Mejorar los diagnósticos diferenciales mediante técnicas de histoquímica, inmunohistoquímica y biología molecular.	Para mantener el estatus Sanitario de la Comunidad Autónoma de Canarias, incluida en el Capítulo 2 del Anexo I de la referida Decisión 2003/467/CE como región oficialmente indemne de tuberculosis bovina, mediante la Decisión de Ejecución (UE) 2017/252, de la Comisión, de 9 de febrero de 2017, por la que se modificó el Anexo II de la Decisión 93/52/CEE y por la que se modificaron los anexos de la Decisión 2003/467/CE.

Publicaciones derivadas

Web: https://www.youtube.com/channel/UCZtpmHot_gEoGGvtq57-tsQ/about

Twitter: @IUSAeu

Proyectos o contratos financiados

1. **Ref. 2019SP41** "La Paratuberculosis (PTB) Caprina, principal amenaza para la "joya de la ganadería canaria": Necesidad de avances en diagnóstico, control y prevención en las Islas Canarias."
Organismo financiador: Fundación Caixa y CajaCanarias.
Duración: 01/03/2020 - 31/12/2022.
Investigadora Principal: Marisa Andrada.
2. **Ref. ProID2020010047.** "La Paratuberculosis (PTB) Caprina, principal amenaza para la "joya de la ganadería canaria": Necesidad de avances en diagnóstico, control y prevención en las Islas Canarias."
Organismo financiador: Gobierno de Canarias
Duración: 01/03/2020 - 31/05/2022.
Investigadora Principal: Marisa Andrada.
3. **CT-36/20- 240/035/0135.** Estudios en Materia de Sanidad Animal para el Ejercicio 2020.
Organismo Financiador: Gobierno de Canarias.
Duración: 18/12/2020 hasta 31/12/2020.
Investigador principal: Antonio Fernández Rodríguez.
4. **CT-23/19- 240/035/0128.** Estudio anatomopatológico de seguimiento al control de la tuberculosis en rumiantes en las islas canarias (2019). Asesoramiento científico-técnico para el diagnóstico anatomopatológico de la paratuberculosis en rumiantes en las islas canarias (2019).
Organismo Financiador: Gobierno de Canarias.
Duración: 16/12/2019 hasta 31/12/2019.

ConGen – Conservation Genetics and Wildlife Management

CIBIO – Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos

Universidade do Porto



Involucrados con el tema de tuberculosis:

Paulo Célio Alves
Nuno Santos
Saúl Jiménez Ruiz

João Queirós
Pedro Monterroso

Contacto: Nuno Santos

nuno.santos@cibio.up.pt / pygargusv@sapo.pt

<https://cibio.up.pt/en/groups/conservation-genetics-and-wildlife-management-congen/>

Historia

The main goal of CONGEN is to increase the scientific knowledge on the evolutionary biology, life traits, ecology, behaviour and diseases of species and populations, to promote their conservation and management. The group uses multiple approaches, and it aims to evaluating biodiversity values under socio-economic development and sustainability.

The group covers diverse theoretical backgrounds that are structured into three main themes:

-MULTI-SCALE ECOLOGY: research on ecology, behavior, emerging diseases, biogeography, genomics, genetic diversity and evolutionary population history. We develop and apply multidisciplinary approaches, including genetics/genomics, ecological modelling, population ecology and landscape analysis, for the management and conservation of wildlife, including small populations, threatened species, endemisms and game species.

-PRODUCTION TOOLS FOR POPULATION'S MANAGEMENT AND CONSERVATION: this implies developing and optimizing standardized monitoring protocols, with particular focus on non-invasive methods, to support conservation and management actions of wild populations, improving biodiversity surveys on natural areas, or estimating abundance.

-OUTREACH & SOCIETY: due to the deep engagement in species conservation and management, several members have been actively producing information for managers, policy makers and stakeholders of different sectors of society, including public institutions, NGOs, private companies, and international institutions (IUCN). We are involved in several outreach activities through the organization of international meetings and workshops, or in diverse activities with the general public through environmental education actions, workshops and consultancy.

Avances de la investigación entre 2019-2022

Taking advantage of the multidisciplinary research team of ConGen, with heavy emphasis on ecology and non-invasive methods, the guiding principle of our research on the epidemiology of animal tuberculosis is to promote the exchange of concepts and methodologies between ecology and epidemiology.

Our main research line is on quantitative epidemiology, focusing on the characterization of the multi-host community of animal tuberculosis, and estimating the relative contribution of each host species to TB persistence in multi-host communities. Using Bayesian methods to estimate the size of the host community incorporating the uncertainty in the abundance and prevalence estimates, we have shown that the multi-host community of TB in the Iberian Peninsula is diverse and dominated by wildlife, with a large contribution of non-bovine livestock. Cattle likely represent <10% of the infected animals in the Iberian Peninsula, highlighting the need to account for the multi-host community in the scope of the eradication programs of Spain and Portugal (Santos et al., 2020).

We are now working on a project (WildLivesTB) that aims to estimate the basic reproduction number (R_0) of several species in the multi-host community, applying concepts and methods from the disease ecology field (project WildLivesTB). Preliminary results show that the wild boar is the main maintenance host in 18/29 study sites in the Iberian Peninsula, with the red deer taking that place in 3/29. The prevalence of TB in the red deer seems to have a disproportionate role in shaping the maintenance host status of wild boar and red deer, while the wild boar is likely an amplifier host bridging the wild and livestock communities. (Santos et al., 2022)

Futuro

In the scope of the WildLivesTB project we are collecting data to estimate the R_0 of *Mycobacterium tuberculosis* complex in other wild and livestock species of the multi-host community. Such approach allows to identify at each site the main maintenance hosts of TB and consequently to inform the control programs. Eventually it will allow to tailor control actions at local level (farm/region), depending on the local epidemiological scenario, and to specifically target control to the reservoirs responsible for spillover to cattle.

We are starting a research line on the environmental reservoir of TB, using molecular tools to detect MTC in non-invasive samples (water, soil, faeces, etc).

Resumen

Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB			
Campo	Resultado	Aplicación	Referencia
Epidemiología	Identificación del papel del jabalí y ciervo como hospedadores de mantenimiento de TB en la Península Ibérica: jabalí como posible hospedador de amplificación y puente entre fauna y ganado, ciervo como pieza central en ciclo en fauna	El principal hospedador salvaje de manutención de TB varía entre zonas Necesario incluir a las otras especies de ganado y fauna de la comunidad de hospedadores en futuros estudios	1
Epidemiología	Quantificación de la comunidad multi-hospedadores de TB en la Península Ibérica	Evidencia de que el control de TB no debería focalizarse solo en los bovinos, hay que considerar la restante comunidad de hospedadores	3
Diagnostico	Cambios en el microbiota de jabalí en un gradiente de TB evidenciados por metaproteómica	Metaproteómica como una herramienta para el estudio de coinfecciones	4
Epidemiología	Evidencia genética de selección de jabalí por la TB. Evidencia de que la diversidad genética de jabalí impacta su susceptibilidad frente a la TB	Manipulación de la diversidad genética de las poblaciones de hospedadores como herramienta de control de TB	5
Control	Mapa de riesgo de presencia de TB en jabalí en Portugal	Evidencia de que la TB en fauna no se restringe a la zona oficial de riesgo de TB en caza mayor	7

Objetivos inmediatos y su beneficio potencial para el control de TB		
Campo	Objetivo	Beneficio
Epidemiología	Estima del R_0 en todas las especies de la comunidad de hospedadores en zonas-centinela en la Península Ibérica	Identificación de los hospedadores de mantenimiento de TB a nivel local (finca/región) y factores que lo influencia.
Control	Estima del R_0 en todas las especies de la comunidad de hospedadores en zonas-centinela en la Península Ibérica	Permitirá futuramente dirigir el control a la especie principal de hospedador a nivel local
Epidemiología	Utilización de modelos de “site-occupancy” para mejorar las estimas de prevalencia real, corrigiendo por la sensibilidad imperfecta del método de diagnóstico (PCR, cultivo)	Estimas más próximas de prevalencia real de TB en fauna

Publicaciones derivadas

1. Santos, N., Ferreras Colino, E., Arnal, M.C., Fernández de Luco, D., Sevilla, I., Garrido, J.M., Fonseca, E., Valente, A.M., Balseiro, A., Queirós, J., Almeida, V., Vicente, J., Gortázar, C., & Alves, P.C. (2022). Complementary roles of wild boar and red deer to animal tuberculosis maintenance in multi-host communities. *Epidemics*, 41, 100633. <https://doi.org/10.1016/j.epidem.2022.100633>
2. Rajbhandari, R.M., de la Fuente, J., Karmacharya, D., Mathema, S., Maharjan, B., Dixit, S.M., Shrestha, N., Queirós, J., Gortázar, C. & Alves, P.C. (2022). Understanding *Mycobacterium tuberculosis* complex in elephants through a One Health approach: a systematic review. *BMC Veterinary Research*, 18(1), 1-15. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03356-8>
3. Santos, N., Richomme, C., Nunes, T., Vicente, J., Alves, P.C., de la Fuente, J., Correia-Neves, M., Boschiroli, M.L., Delahay, R., & Gortázar, C. (2020). Quantification of the animal tuberculosis multi-host community offers insights for control. *Pathogens*, 9, 421. doi:10.3390/pathogens9060421
4. Queirós, J., Villar, M., Hernández-Jarguín, A., López, V., de Mera, I.F., Vicente, J., Alves, P.C., Gortázar, C. & de la Fuente, J. (2019). A metaproteomics approach reveals changes in mandibular lymph node microbiota of wild boar naturally exposed to an increasing trend of *Mycobacterium tuberculosis* complex infection. *Tuberculosis*, 114, 103-112. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2018.12.003>
5. Queirós, J. & Vicente, J. (2018). Inbreeding shapes tuberculosis progression in female adult badgers (*Meles meles*). *Journal of Animal Ecology*, 87(6), 1497-1499. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.12901>
6. Queirós, J., Alves, P.C., Vicente, J., Gortázar, C. & de la Fuente, J. (2018). Genome-wide associations identify novel candidate loci associated with genetic susceptibility to tuberculosis in wild boar. *Scientific reports*, 8(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20158-x>
7. Santos, N., Nunes, T., Fonseca, C., Vieira-Pinto, M., Almeida, V., Gortázar, C., & Correia-Neves, M. (2018). Spatial analysis of wildlife tuberculosis based on a serologic survey using dried blood spots, Portugal. *Emerging Infectious Diseases*, 24(12), 2169-2175. doi:10.3201/eid2412.171357

Artículo divulgación

Cunha M.V., Reis, A.C., Pereira, A.C., Ramos, B., Albuquerque, T., Botelho, A., & Santos, N. (2019). Tuberculose animal: diagnóstico, epidemiologia, investigação e controlo. *Vida Rural*

Proyectos o contratos financiados

1. **Título del proyecto:** WildLivesTB - The Wildlife-Livestock interface of bovine TuBerculosis: quantifying the role of each species in disease transmission in multi-host communities (EXPL/CVT-CVT/1525/2021)
Entidad financiadora: Fundação para a Ciência e Tecnologia, Portugal
Duración: 2022-2023
Investigador principal: Nuno Santos
2. **Título del proyecto:** Colossus - Control Of tubercuLOsiS at the wildlife-livestock interface uSing innovative natUre-based Solutions (PTDC/CVT-CVT/29783/2017)
Entidad financiadora: Fundação para a Ciência e Tecnologia, Portugal
Duración: 2018-2022
Investigador principal: Mónica Cunha (CE3C)

Laboratorio de Referencia Europeo (EU-RL) de Tuberculosis Bovina



Beatriz Romero Martínez
Julio Álvarez Sánchez
Javier Bezos Garrido
Lucas Domínguez Rodríguez

Francisco J. Lozano Barrilero
Antonio M. Rodríguez Bertos
Lucía de Juan Ferré

Contacto: Lucía de Juan Ferré

dejuan@ucm.es

www.bovinetuberculosis.eu

Historia

El Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) de la Universidad Complutense de Madrid fue nombrado Laboratorio de Referencia Europeo (EU-RL) de Tuberculosis Bovina en el año 2008 (EC 737/2008). En el artículo 94 del Reglamento 2017/625 se especifican las responsabilidades y tareas de los laboratorios de referencia de la Unión Europea. En resumen, las principales actividades del EU-RL son el i) desarrollo, evaluación y/o mejora de las técnicas diagnósticas oficiales y/o alternativas para el diagnóstico de la tuberculosis; ii) estandarización de protocolos y elaboración de material de referencia; iii) organización de ensayos intercomparativos; y iv) asistencia técnica y científica a los Laboratorios Nacionales de Referencia. El personal del EU-RL, que a su vez forma parte del equipo de investigadores de los servicios de Micobacterias y de Patología Animal y Veterinaria Forense del Centro VISAVET, posee una larga trayectoria en el desarrollo, puesta a punto, mejora y evaluación de las técnicas diagnósticas de tuberculosis en ganado bovino y otras especies domésticas y salvajes. Cada año, el EU-RL elabora un programa de trabajo, en colaboración con el responsable de la Comisión Europea y los Laboratorios Nacionales de Referencia (LNR) de la Unión Europea, donde se incluyen las actividades que se van a desarrollar para cubrir las necesidades de los distintos laboratorios. Además, el EU-RL tiene una colaboración activa con el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación y el Laboratorio Nacional de Referencia de tuberculosis en Granada.

Avances de la investigación entre 2019-2022

Desde la designación del EU-RL en 2008, sus actividades se han centrado en el desarrollo, evaluación y mejora de las técnicas diagnósticas de tuberculosis. El cambio más relevante en los últimos años es la entrada en vigor del Reglamento 2016/429 relativo a las enfermedades transmisibles de los animales ("Ley de Sanidad Animal") en el que el EU-RL

cobra especial protagonismo. En este sentido se especifica que el EU-RL debe cooperar dentro de una red de laboratorios de la Unión Europea dedicados a la sanidad animal para garantizar que la vigilancia, notificación e información sobre enfermedades, programas de erradicación, la definición de estatus de libre de enfermedad y los desplazamientos de animales y productos dentro de la Unión, se sustenten en análisis, pruebas y diagnósticos de laboratorio de última generación, sólidos y fiables. Desde el 21 de abril del 2021 el EU-RL tiene disponibles en su página web los protocolos para calificación y mantenimiento del estatus de libre de infección por miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en bovinos y para el movimiento de bovinos, camélidos y caprinos. Actualmente está trabajando en la puesta a punto de los protocolos diagnósticos previos al movimiento para los cérvidos, al mismo tiempo que realiza estudios de campo para generar resultados adicionales que sean de utilidad para los estados miembros de la Unión Europea. Para la realización de este y otros protocolos de diagnóstico el EU-RL tiene una base de datos con material de referencia disponible bajo petición de los LNRs (suero, plasma, tejido, cepas, ADN, etc.). Como novedad más reciente, el EU-RL tiene una nueva base de datos de secuencias de miembros del complejo *M. tuberculosis* y ha realizado recientemente un estudio para definir la influencia del uso de distintas herramientas bioinformáticas para el análisis de variantes genéticas de *M. bovis*.

Por último, el EU-RL sigue trabajando en la optimización y mejora de las pruebas oficiales de diagnóstico de la tuberculosis caracterizando las micobacterias no tuberculosas que pueden interferir en el diagnóstico, en la evaluación de los sistemas de inoculación de las PPDs para la intradermotuberculinización y en el estudio del uso fraudulento de corticosteroides y sustancias caústicas/irritantes para la alteración de los resultados de las pruebas oficiales (IDTB). Además, de trabajar en las técnicas oficiales, el EU-RL evalúa otras alternativas metodológicas para su posible uso en el diagnóstico. En este sentido, cabe destacar los trabajos que se han realizado para la evaluación y optimización de PCRs para la identificación de *M. caprae* y *M. bovis*, el uso del MALDI-TOF para la identificación de micobacterias, así como métodos alternativos para la extracción directa de ADN de muestras biológicas y la puesta a punto de técnicas histopatológicas (inmunohistoquímica, utilización de distintos anticuerpos, etc.). Además, el EU-RL sigue participando en el grupo de trabajo, que creó la Organización Mundial de la Sanidad Animal, para la sustitución del estándar internacional de PPD bovina.

Futuro

Las actividades futuras del EU-RL están ligadas principalmente a la implementación de los requerimientos de la nueva Ley de Sanidad Animal (Reglamento 2016/429) en lo relacionado con los protocolos que debe tener disponibles en su página web. Para ello, el EU-RL realizará estudios de campo para la implementación de los protocolos publicados, realizando modificaciones si fuera necesario, o incorporando nuevos protocolos que mejoren la sensibilidad y especificidad de las técnicas recomendadas y actualmente disponibles. Además de estas actividades en relación con el diagnóstico *ante mortem*, el EU-RL se centrará en dos aspectos importantes para el diagnóstico *post mortem*: por un lado, la optimización, evaluación y validación de los protocolos de extracción directa de tejido que permita, a diferencia de los que existen actualmente, la caracterización molecular mediante secuenciación de las muestras positivas, y por otro, la estrategia de aplicación de los protocolos de diagnóstico histopatológico e inmunohistoquímico. Además, como actividad prioritaria, el EU-RL seguirá trabajando en la elaboración de material de referencia para los Laboratorios Nacionales de Referencia.

Resumen

Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB			
Campo	Resultado	Aplicación	Referencia
Diagnóstico	Rendimiento de pruebas diagnósticas de tuberculosis en bovinos, camélidos, caprinos y cérvidos	Requerimientos del Reglamento 2016/429	Protocolos página web del EU-RL 8, 9
Diagnóstico	Validación de PCRs en tiempo real para diagnóstico de tuberculosis	Aplicación en programas de erradicación de tuberculosis	2, 3
Diagnóstico	Protocolo de MALDI-TOF para la identificación de micobacterias no tuberculosas	Aplicación en programas de erradicación de tuberculosis	5
Diagnóstico	Proporcionar material de referencia. Organización de ensayos de intercomparación.	Puesta a punto de protocolos y estandarización. Establecimiento de criterios básicos para diagnóstico histológico. Aseguramiento de la calidad de los resultados.	Protocolos y material de referencia del EU-RL. Evidenciar la competencia técnica según ISO 17025.
Epidemiología	Análisis y centralización de la información molecular	Epidemiología molecular	mycoDB.org 4

Objetivos inmediatos y su beneficio potencial para el control de TB		
Campo	Objetivo	Beneficio
Diagnóstico	Protocolos de movimiento para bovinos, camélidos, caprinos y cérvidos.	Estandarización de los protocolos a nivel de la Unión Europea.
Diagnóstico	Protocolos de calificación y mantenimiento de estatus de libre en bovinos.	Estandarización de los protocolos a nivel de la Unión Europea.
Diagnóstico	Estudio de metodologías alternativas al diagnóstico <i>ante y post mortem</i> .	Mejorar de los programas de erradicación de tuberculosis. Reducción en el tiempo de recuperación de la calificación de las explotaciones
Diagnóstico	Estudios de campo aplicando métodos alternativos al cultivo bacteriológico	Mejorar el diagnóstico de tuberculosis y agilizar la obtención de resultados.
Diagnóstico	Estandarización de protocolos. Técnicas complementarias.	Mejorar y complementar el diagnóstico de tuberculosis.
Epidemiología	Mantenimiento de bases de datos internacional y mejorar la calidad del ADN obtenido directamente de tejido	Centralización de la información epidemiológica a nivel molecular y

Publicaciones derivadas

1. European Union Reference Laboratory for Bovine Tuberculosis. [Accessed: 8 Nov 2022]. Available at: <http://www.bovinetuberculosis.eu>.
2. Lorente-Leal, V., Liandris, E., Castellanos, E., Bezos, J., Domínguez, L., de Juan, L., Romero B. (2019). Validation of a Real-Time PCR for the Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Members in Bovine Tissue Samples. *Frontiers in veterinary science*, 6(61):1-9. doi:10.3389/fvets.2019.00061.
3. Lorente-Leal, V., Farrell, D., Romero, B., Álvarez, J., de Juan, L., Gordon, S.V. (2021a). Performance and Agreement Between WGS Variant Calling Pipelines Used for Bovine Tuberculosis Control: Toward International Standardization. *Frontiers in veterinary science*, 8:780018. doi:10.3389/fvets.2021.780018.
4. Lorente-Leal, V., Liandris, E., Pacciarini, M., Botelho, A., Kenny, K., Loyo, B., Fernández, R., Bezos, J., Domínguez, L., de Juan, L., Romero, B. (2021b). Direct PCR on tissue samples to detect *Mycobacterium tuberculosis* complex: an alternative to the bacteriological culture. *Journal of Clinical Microbiology*, 59(2):e01404-20. Doi:10.1128/JCM.01404-20.
5. Lorente-Leal, V., Liandris, E., Bezos, J., Pérez-Sancho, M., Romero, B., de Juan, L. (2022). MALDI-TOF Mass Spectrometry as a Rapid Screening Alternative for Non-tuberculous Mycobacterial Species Identification in the Veterinary Laboratory. *Frontiers in veterinary science*, 9:827702. doi: 10.3389/fvets.2022.827702.
6. Mbovis.org. *Mycobacterium bovis* Spoligotype Database. [Accessed: 8 Nov 2022]. Available at: <https://www.mbovis.org>.
7. Neila, C., Rebollada-Merino, A., Bezos, J., de Juan, L., Domínguez, L., Rodríguez-Bertos, A. (2022). Extracellular matrix proteins (fibronectin, collagen III, and collagen I) immunoexpression in goat tuberculous granulomas (*Mycobacterium caprae*). *Vet Res Commun*. In press. doi: 10.1007/s11259-022-09996-3.
8. Ortega, J., Roy, A., Álvarez, J., Sánchez-Cesteros, J., Romero, B., Infantes-Lorenzo, J.A., Saez-Llorente, J.L., Lopez, M., Domínguez, L., de Juan, L., Bezos, J. (2021). Effect of the inoculation site of bovine and avian purified protein derivatives (PPDs) on the performance of the intradermal tuberculin test in goats from tuberculosis- free and infected herds. *Frontiers in veterinary science*, 8:722825. doi:10.3389/fvets.2021.722825.
9. Ortega, J., Roy, A., Díaz-Castillo, A., de Juan, L., Romero, B., Sáez-Llorente, J.L., Domínguez, L., Regal, P., Infantes-Lorenzo, J.A., Álvarez, J., Bezos, J. (2022). Effect of the topical administration of corticosteroids and tuberculin pre-sensitisation on the diagnosis of tuberculosis in goats. *BMC Vet Res*, 18(1):58. doi:10.1186/s12917-022-03156-0.

Universidad Autónoma de Barcelona (UAB) Grup de Recerca en Malalties Transmissibles en Sanitat Animal (TRANSMISAN)



Natalia Ciria
Alberto Allepuz
Margarida Arede

Jordi Casal
Giovanna Ciaravino
Fernando Duarte

Contacto: Alberto Allepuz

alberto.allepuz@uab.cat

Historia

El grupo de investigación de la UAB está integrado en el “Grup de Recerca en Malalties Transmissibles en Sanitat Animal (TRANSMISAN)” de esta universidad que centra su actividad en la sanidad animal, particularmente en el estudio de enfermedades transmisibles causadas por microorganismos y parásitos. Las principales áreas de trabajo son: a) la epidemiología de estos procesos, con especial atención a los aspectos de análisis de riesgo y la bioseguridad de la producción ganadera, b) la inmunología y vacunología aplicada a las enfermedades transmisibles de la producción ganadera, c) el estudio de las resistencias a los agentes antimicrobianos y los factores que influyen en su presentación y mantenimiento y, d) las parasitosis en colectivos de gatos y perros y su importancia en la salud pública. En los últimos 5 años, el grupo ha publicado cerca de 100 artículos en revistas internacionales indexadas, la mayoría de los cuales se encuentran en el primer cuartil. Asimismo, ha liderado varios proyectos de investigación competitivos, tanto nacionales como internacionales y ha sido responsable de numerosos contratos de investigación con empresas e instituciones.

Avances de la investigación entre 2019-2022

En relación con la investigación en tuberculosis animal y la bioseguridad, en los últimos 5 años ha trabajado en el proyecto Innotub (www.innotub.es) del Programa Interreg POCTEFA (2004-2020) de desarrollo regional (EFA357/INNOTUB); en el proyecto “Bioseguridad en bovino de leche: prácticas en el transporte de animales, desarrollo de un modelo de análisis de riesgo genérico y coste-beneficio de las medidas (BioRisk)” financiado por la agencia estatal de investigación y en varios contratos menores por encargo del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Además de ello, coordina una COST Action llamada BETTER (<https://better-biosecurity.eu/>) que está centrada en bioseguridad en la ganadería.

Los diferentes proyectos y contratos se han centrado en tres líneas principales:

- Entender las causas de nuevas infecciones en rebaños de bovino
- Bioseguridad: análisis de riesgo y aceptabilidad de las medidas
- Aspectos sociológicos y de comunicación relacionados con el programa

Futuro

En los próximos años, se pretenden llevar a cabo nuevos estudios de investigación y concluir algunos iniciados recientemente. Entre las líneas a desarrollar, en colaboración con otros grupos de investigación, se incluyen:

- Profundizar en las causas de nuevas infecciones en rebaños de bovino.
- Optimizar la gestión del riesgo de la tuberculosis animal mediante la mejora de la bioseguridad de las explotaciones.
- Contribuir a la toma de decisiones informadas mediante el desarrollo de plataformas que permitan evaluar el riesgo de infección de las explotaciones y la reducción esperada del riesgo al aplicar determinadas medidas.
- Promover la mejora de la comunicación acerca de temas sanitarios mediante la evaluación de diferentes estrategias de comunicación.

Resumen

Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB			
Campo	Resultado	Aplicación	Referencia
Epidemiología	Causas más probables de nuevas infecciones de tuberculosis animal en rebaños de bovino de diferentes puntos de España.	Reforzar las medidas existentes en el programa y/o establecer nuevas acciones.	1
Epidemiología	Los jabalíes fueron capaces de mantener <i>M.caprae</i> en su población y transmitirlo al caprino, que actuó como reservorio en la zona del parque natural del Montseny en Cataluña.	Comprender la transmisión de la tuberculosis en una zona y reforzar el programa acorde a dicha cadena de transmisión.	2
Epidemiología	Las medidas de bioseguridad más apreciadas en relación con los animales domésticos por parte de ganaderos y veterinarios, teniendo en cuenta los criterios de coste económico, facilidad de poner en práctica y mantenerla en el tiempo, así como su efectividad esperada para prevenir el contagio, fueron evitar el préstamo de sementales, el uso de mangas exclusivas, y en menor medida, el desvieje precoz. Los vallados y el uso de transportes exclusivos tuvieron un grado de aceptabilidad muy bajo. Sobre los silvestres, los resultados no mostraron ninguna medida que destacara sobre las otras de una manera evidente.	Adaptar las recomendaciones en materia de bioseguridad a la percepción de ganaderos y veterinarios acerca de la viabilidad de dichas medidas.	Artículo en preparación

Epidemiología	<p>Las opiniones acerca del programa de tuberculosis animal están enfrentadas. El único tema que genera consenso es el de la necesidad de erradicar la tuberculosis del ganado bovino para evitar las restricciones comerciales. Las estrategias de formación, el potencial zoonótico de la tuberculosis y las perspectivas sobre la posibilidad de erradicar la tuberculosis con el programa actual, son temas que se pueden debatir, y que no generan unas discrepancias excesivas. Sin embargo, existen muchos temas en los que las posiciones están muy enfrentadas como son aspectos relacionados con la subjetividad de la interpretación de la prueba de la tuberculina, la autorización la prueba comparada en casos concretos, la posibilidad de que los animales positivos pero sin lesiones en matadero sean falsos positivos, quien debiera hacer el saneamiento (veterinarios contratados por los servicios veterinarios oficiales o bien veterinarios clínicos/ADS) cómo de transparente es la administración en la comunicación de resultados o bien las posibilidades de éxito del programa de erradicación de tuberculosis en presencia de reservorios silvestres.</p>	Reforzar la comunicación sobre el programa de tuberculosis animal teniendo en cuenta estas opiniones.	Artículo en preparación
---------------	---	---	-------------------------

<p>Epidemiología</p>	<p>La visión del programa de erradicación de tuberculosis animal es diferente en función del colectivo. La administración y los científicos emplean metáforas de lucha y avances, sin embargo, los ganaderos y veterinarios se sitúan en un marco de estancamiento y de sacrificio. Las actividades participativas llevadas a cabo con estos colectivos plantearon una serie de mejoras en la comunicación acerca de la tuberculosis como son la creación de espacios comunicativos y participativos para contribuir a la búsqueda de soluciones. Mejorar la accesibilidad de la información: actualización de webs, bases de datos compartidas, etc. Elaborar información visual: infografías, vídeos cortos, fichas, etc. Rediseñar los cursos formativos para poder compartir experiencias y conocimientos de campo, inclusión de contenidos relacionados con aspectos sociales, económicos, políticos, administrativos, etc. Tener normas y protocolos más claros y adaptables a casos concretos, sin generar agravios comparativos (flexibilidad protocolizada). Dar más valor al trabajo realizado tanto por los veterinarios como por los ganaderos. Realizar acciones de pedagogía entre la población en general para poner en valor las funciones y aportaciones del sector ganadero a la sociedad. Realizar las inspecciones como un acompañamiento y apoyo de forma que no sean vividas (sólo) como fiscalizadoras. Tener más voz (mayor participación) a la hora de diseñar los protocolos. Y crear un 'Comité de Crisis' formado por representantes de los ganaderos, de los veterinarios y de la administración, que pudiera apoyar la toma de decisiones sobre casos concretos.</p>	<p>Reforzar la comunicación sobre el programa de tuberculosis animal teniendo en cuenta estas propuestas.</p>	<p>Artículo en preparación</p>
----------------------	--	---	--------------------------------

Objetivos inmediatos y su beneficio potencial para el control de TB		
Campo	Objetivo	Beneficio
Epidemiología	Desarrollar herramientas que permitan la toma de decisiones informadas basadas en las particularidades de cada explotación.	Concienciar y educar en materia de bioseguridad. Mejorar el nivel de bioseguridad de las explotaciones y del transporte de animales.
Epidemiología	Mejorar la comunicación acerca de temas sanitarios.	Incrementar la aceptabilidad de los programas sanitarios y la concienciación en materia de bioseguridad.
Epidemiología	Comprender las cadenas de transmisión que conducen a la aparición de nuevas infecciones.	Adaptar las medidas de control para evitar las cadenas de transmisión.
Epidemiología	Comprender los factores psico-sociales que influyen en la toma de decisiones sobre la aplicación de medidas de bioseguridad.	Adaptar la comunicación y formación a la percepción y necesidades de ganaderos y veterinarios.

Publicaciones derivadas

1. Ciaravino G, Laranjo-González M, Casal J, Sáez-Llorente JL, Allepuz A. Most likely causes of infection and risk factors for tuberculosis in Spanish cattle herds. *Vet Rec.* 2021a Jul;189(2):e140. doi: 10.1002/vetr.140. Epub 2021 Feb 10. PMID: 34297366.
2. Ciaravino G, Vidal E, Cortey M, Martín M, Sanz A, Mercader I, Perea C, Robbe-Austerman S, Allepuz A, Pérez de Val B. Phylogenetic relationships investigation of *Mycobacterium caprae* strains from sympatric wild boar and goats based on whole genome sequencing. *Transbound Emerg Dis.* 2021b May;68(3):1476-1486. doi: 10.1111/tbed.13816. Epub 2020 Sep 13. PMID: 32888386; PMCID: PMC8246549.
3. Perea, C; Ciaravino, G; Stuber, T; Thacker, TC; Robbe-Austerman, S; Allepuz, A; De Val, BP (2021c). Whole-Genome SNP Analysis Identifies Putative *Mycobacterium bovis* Transmission Clusters in Livestock and Wildlife in Catalonia, Spain. *Microorganisms*, 30;9(8):1629. doi:10.3390/microorganisms9081629.
4. Ciaravino, G, Espluga, J., Casal, J., Pacios, A., Mercader, I., & Allepuz, A. (2020). Profiles of opinions among farmers and veterinarians towards the Tuberculosis Eradication Programme in cattle in Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 104941. doi:10.1016/j.prevetmed.2020.104941
5. Napp, S., Ciaravino, G, de Val, B. P., Casal, J., Saéz, J. L., & Alba, A. (2019). Evaluation of the effectiveness of the surveillance system for tuberculosis in cattle in Spain. *Preventive veterinary medicine*, 173, 104805. doi:10.1016/j.prevetmed.2019.104805.

Proyectos y Contratos financiados

1. **Título del proyecto:** EFA357/19. Red transpirenaica de investigación y desarrollo de herramientas innovadoras para el control de la tuberculosis animal
Entidad financiadora: Unión Europea, Programa Interreg
Duración: 15/10/19 - 31/05/22
Investigador principal: Bernat Pérez (IRTA-CReSA)
2. **Título del proyecto:** Bioseguridad en bovino de leche: prácticas en el transporte de animales, desarrollo de un modelo de análisis de riesgo genérico y coste-beneficio de las medidas (BioRisk).
Entidad financiadora: Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2020-118302RB-I00)
Duración: 31/8/2021 hasta 31/8/2025
Investigador principal: Alberto Allepuz y Jordi Casal (UAB)
3. **Título del proyecto:** CA20103 - Biosecurity Enhanced Through Training Evaluation and Raising Awareness (BETTER)
Entidad financiadora: Comisión Europea
Duración: 21/10/2021 hasta 20/10/2025
Investigador principal: Alberto Allepuz (UAB)
4. **Título del proyecto:** La integración de análisis de riesgo en sistemas para la evaluación de la bioseguridad
Entidad financiadora: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
Duración: 5/07/2022 - 31/12/2022
Investigador principal: Alberto Allepuz (UAB)
5. **Título del proyecto:** Realización de una plataforma para el análisis de riesgo de entrada de tuberculosis y visualización de la información relacionados con las medidas de bioseguridad en explotaciones ganaderas de ganado bovino
Entidad financiadora: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación

Duración: 20/07/2021 - 31/12/2021

Investigador principal: Alberto Allepuz (UAB)

6. **Título del proyecto:** Realización de un estudio sobre factores sociológicos relacionados con la aplicación de las medidas de bioseguridad en explotaciones bovinas para el control del complejo *Mycobacterium tuberculosis*

Entidad financiadora: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación

Duración: 2/07/2020 - 31/12/2020

Investigador principal: Alberto Allepuz (UAB)

7. **Título del proyecto:** Estudio sobre factores sociológicos relacionados al programa nacional de erradicación de la tuberculosis bovina

Entidad financiadora: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación

Duración: 22/05/19 - 31/12/19

Investigador principal: Alberto Allepuz (UAB)

8. **Título del proyecto:** Evaluación de datos generados por las encuestas epidemiológicas de tuberculosis 2014-2016.

Entidad financiadora: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación

Duración: 15/06/18 - 31/12/18

Investigador principal: Alberto Allepuz (UAB)

Servicio de Micobacterias – Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET-UCM)



Julio Álvarez Sánchez
Javier Bezos Garrido
Lucas Domínguez
Rodríguez
Lucía de Juan Ferré

Alberto Gómez Buendía
Víctor Lorente Leal
Francisco J. Lozano
Barrilero
Javier Ortega Martín

Pilar Pozo Piñol
Antonio M. Rodríguez
Bertos
Beatriz Romero Martínez

Contacto: Beatriz Romero Martínez

bromerom@visavet.ucm.es

<https://www.visavet.es/>

Historia

El Servicio de Micobacterias del Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (VISAVET-UCM) lleva trabajando desde hace más de 20 años en el campo del diagnóstico, la epidemiología y el control de las infecciones producidas por bacterias pertenecientes al género *Mycobacterium*, fundamentalmente tuberculosis y paratuberculosis. Las principales líneas de investigación del grupo son la puesta punto de nuevas tecnologías para el diagnóstico *in vivo* e *in vitro* de las principales enfermedades causadas por micobacterias en animales, así como la implementación de herramientas moleculares que permitan una rápida identificación de los agentes etiológicos y que proporcionen información para la realización de estudios de caracterización molecular. Además, desempeña un papel importante en el diseño de estudios de campo para su aplicación en programas de control y erradicación en situaciones problemáticas. Gracias a sus instalaciones, con laboratorios y animalarios de nivel 3 de bioseguridad y acceso a granjas experimentales, se han llevado a cabo experiencias de infección natural y experimental y evaluación de la eficacia vacunal en diversas especies animales. Algunos de los logros obtenidos en estos campos han sido posibles gracias a la estrecha colaboración con otros grupos de investigación nacionales e internacionales mediante proyectos de investigación competitivos o acuerdos de colaboración. Por último, desde el Servicio se han

venido realizando además labores de asesoría a los servicios oficiales veterinarios de distintas Comunidades Autónomas, núcleos zoológicos, ganaderos y veterinarios, así como a Ministerios en el diagnóstico y el control de las micobacteriosis en animales.

Avances de la investigación entre 2019-2022

En los últimos años, nuestro grupo de investigación ha potenciado las líneas de trabajo de diagnóstico, epidemiología y control de la tuberculosis animal, gracias a varios proyectos de investigación nacionales, contratos con las Administraciones Públicas y/o colaboraciones con otros grupos de investigación.

El área de diagnóstico se ha centrado en la evaluación de técnicas para la detección de la tuberculosis en distintas especies de rumiantes domésticos (ganado bovino, caprino, ovino), camélidos, y otros animales silvestres. Ha empleado un enfoque basado en métodos tradicionales o innovadores. El enfoque tradicional ha proporcionado información sobre la puesta a punto de protocolos, evaluando la especificidad y sensibilidad de las pruebas. Como ejemplos, la PCR directa sobre tejido o la inmunohistoquímica, la comparativa de los ensayos para la detección de IFN- γ o la serología basada en el complejo proteico P22, que ha sido evaluada en varias matrices (suero, leche, saliva) y que se propone como una técnica complementaria a la intradermotuberculinización (IDTB) para maximizar la detección de la tuberculosis en cabras. La evaluación de los sistemas de inoculación empleados en España para la prueba IDTB también se ha evaluado concluyendo que no influyen en la especificidad de la prueba. El enfoque innovador se ha generado tras la búsqueda de nuevos sistemas para la detección directa o indirecta de la infección por el complejo *M. tuberculosis*. Como ejemplos están los estudios ambientales en explotaciones bovinas o el empleo de nuevos sistemas para la detección de biomarcadores metabólicos en plasma bovino que evidencia la interacción entre el patógeno y el hospedador.

El empleo de la epidemiología cuantitativa aplicada al control y erradicación de tuberculosis ha destacado mediante la colaboración con distintos servicios veterinarios oficiales en España y en otros países y con otros centros de investigación. Así, se han caracterizado las redes de movimientos de ganado bovino y su posible relación con la transmisión y la vigilancia o el control/erradicación de la tuberculosis bovina en diversas zonas. Se ha demostrado la diferente contribución de los movimientos en el mantenimiento del ciclo de transmisión de *M. bovis* en el ganado en relación con otros factores condicionantes de la epidemiología de la tuberculosis bovina en distintos contextos epidemiológicos. Además, se han caracterización de los factores de riesgo ligados a explotaciones crónicas y recurrentes y hemos trabajado en estimar la probabilidad de detectar rebaños infectados calificados como libres de la enfermedad. Por otra parte, la realización de estudios epidemiológicos moleculares empleando la secuenciación masiva ha sido el segundo pilar en este campo. Esta nueva metodología nos ha permitido evaluar la diversidad genética de dos espoligotipos muy frecuentes en España (SB0339, SB0121), su variabilidad en rebaños persistentemente infectados y/o su posible relación con otras especies animales. Por último, hemos llevado a cabo la comparación entre las distintas herramientas bioinformáticas públicas para el análisis de variantes genéticas en aislados de *M. bovis* con el fin de su estandarización, observando una alta concordancia entre ellas.

Dentro de los estudios relacionados con el control de la enfermedad se encuentra la inspección *post mortem* en mataderos, habiendo aportado información sobre la tasa de detección en Castilla y León y su asociación con algunas variables de riesgo. Estos trabajos se suman a otros realizados para investigar posibles actividades fraudulentas en las pruebas oficiales mediante técnicas avanzadas de histopatología para evaluar las reacciones de hipersensibilidad retardada, y la cromatografía para la detección de tóxicos. Por último, se ha finalizado la evaluación de varios candidatos vacunales empleando cabras como modelo

experimental y sistemas de infección natural o experimental para evaluar la protección conferida por las vacunas.

Futuro

Las principales líneas de investigación a desarrollar en el futuro inmediato se centran en la caracterización de los factores que están limitando el éxito de las campañas de erradicación en zonas tanto de alta como de baja prevalencia de tuberculosis bovina en España. Dicho objetivo general se abordará mediante la consecución de los siguientes objetivos parciales:

1. **Determinación del papel de las micobacterias atípicas en la aparición de falsas reacciones positivas en las pruebas de diagnóstico de la tuberculosis bovina:** la combinación de estudios observacionales (basados en el análisis de los resultados de las pruebas diagnósticas *in vivo* e *in vitro*) y experimentales (mediante la inoculación de cepas preseleccionadas de micobacterias atípicas en ganado bovino en condiciones controladas) permitirá establecer el rol de las micobacterias atípicas en la inducción de falsas reacciones positivas en diferentes pruebas diagnósticas.
2. **Evaluación de antígenos y protocolos de laboratorio alternativos que mejoren la especificidad o sensibilidad de metodologías concretas:** la necesidad de generar información sobre el uso de antígenos más específicos que mantengan la misma especificidad en las pruebas oficiales y en el escenario español es fundamental. Del mismo modo, nuevas y prometedoras metodologías basadas en la detección de metabolitos en plasma/suero mediante resonancia magnética nuclear serán estudiadas en profundidad para evaluar su eficacia y fiabilidad.
3. **Mejoras en la base de datos nacional de micobacteriosis mycoDB.es:** la inclusión de la secuenciación masiva como herramienta molecular permitirá establecer unos mapas epidemiológicos más precisos que ayudarán a establecer relaciones entre brotes a nivel nacional.
4. **Evaluación del papel de la fauna salvaje y el medio ambiente en el mantenimiento de la tuberculosis bovina en los animales domésticos:** la combinación de técnicas de caracterización molecular (secuenciación del genoma completo) y modelos filodinámicos permitirá evaluar el grado de transmisión inter-específica entre la fauna doméstica y la salvaje.
5. **Evaluación de la inmunidad conferida por cepas vacunales BCG u otros antígenos frente a la tuberculosis, y estudios de patogenicidad:** el modelo experimental cabra y los sistemas de infección natural empleados previamente servirán de base para nuevos estudios de seguridad y eficacia de vacunas, así como para profundizar en la patogenicidad de la enfermedad.
6. **Determinación de la eficacia de las estrategias de vigilancia y diagnóstico actuales (pasivas y activas) de tuberculosis bovina a nivel de rebaño en áreas de alta y baja prevalencia:** mediante la aplicación de diferentes aproximaciones analíticas se pretende obtener una estimación precisa de la sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas a nivel de rebaño, así como de los factores relacionados con su falta de fiabilidad.

Resumen

Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB			
Campo	Resultado	Aplicación	Referencia
Diagnóstico	Evaluación de la fiabilidad de las técnicas para el diagnóstico de la tuberculosis en distintas situaciones epidemiológicas	Estimación de la sensibilidad y especificidad de la IDTB y el test IFN- γ .	7, 12
Diagnóstico	Evaluación de la interferencia producida por la vacunación frente a paratuberculosis en caprino y de micobacterias atípicas en bovino. Métodos para la investigación de fraudes	Diseño de programas de control de tuberculosis en el ganado caprino y bovino.	4, 9, 10
Diagnóstico	Puesta a punto y evaluación de nuevas técnicas para el diagnóstico de la tuberculosis animal y detección ambiental	Métodos rápidos y sensibles que mejoren el diagnóstico	4, 5, 6, 9, 18
Epidemiología	Herramientas para la detección de agrupamiento de enfermedad en redes de movimientos. Estudio de factores de riesgo en rebaños crónicos	Evaluar el papel de los movimientos en la transmisión de la tuberculosis bovina	13
Epidemiología	Estudios epidemiológicos moleculares mediante WGS	Investigación de brotes, filogenia, estudio de factores de virulencia, genes de resistencia, etc.	2, 15
Control	Evaluación de la tasa de detección de lesiones en mataderos	Vigilancia activa y pasiva en mataderos	14
Control	Evaluación de vacunación con BCG, <i>M. bovis</i> inactivado o MTBVac en cabra/jabalí	Proveer datos sobre candidatos vacunales de tuberculosis para el control de la enfermedad	1, 17

Objetivos inmediatos y su beneficio potencial para el control de TB		
Campo	Objetivo	Beneficio
Diagnóstico	Estudio del papel de las micobacterias atípicas en la aparición de falsas reacciones positivas en las pruebas de diagnóstico de la tuberculosis bovina	Optimización de la especificidad de las pruebas diagnósticas
Diagnóstico	Empleo de la serología en caprino sobre varias matrices	Aumento de la sensibilidad en programas de caprino en combinación con otras pruebas de diagnóstico oficial
Epidemiología	Empleo de la secuenciación masiva como herramienta epidemiológica a nivel nacional	Investigación de brotes, estudio en explotaciones recurrentes, interacción doméstico-silvestre, generación de información a nivel nacional
Control	Determinación de la eficacia de las estrategias de vigilancia y diagnóstico actuales (pasivas y activas) de tuberculosis bovina a nivel de rebaño en áreas de alta y baja prevalencia	Monitorización de la vigilancia en matadero

Publicaciones derivadas

1. Diez-Delgado I, Sevilla IA, Garrido JM, Romero B, Geijo MV, Dominguez L, Juste RA, Aranzaz A, de la Fuente J and Gortazar C. Tuberculosis vaccination sequence effect on protection in wild boar. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 66:101329. 2019. DOI: 10.1016/j.cimid.2019.101329.
2. Lorente-Leal V, Farrell D, Romero B, Alvarez J, de Juan L and Gordon SV. Performance and Agreement Between WGS Variant Calling Pipelines Used for Bovine Tuberculosis Control: Toward International Standardization. *Frontiers in veterinary science*, 8:780018. 2021a. DOI: 10.3389/fvets.2021.780018.
3. Lorente-Leal V, Liandris E, Pacciarini M, Botelho A, Kenny K, Loyo B, Fernandez R, Bezos J, Dominguez L, de Juan L and Romero B. Direct PCR on tissue samples to detect *Mycobacterium tuberculosis* complex: an alternative to the bacteriological culture. *Journal of Clinical Microbiology*, 59(2):e01404-20. 2021b. DOI: 10.1128/JCM.01404-20.
4. Lorente-Leal V, Liandris E, Bezos J, Perez-Sancho M, Romero B and de Juan L. MALDI-TOF Mass Spectrometry as a Rapid Screening Alternative for Non-tuberculous Mycobacterial Species Identification in the Veterinary Laboratory. *Frontiers in veterinary science*, 9:827702. 2022. DOI: 10.3389/fvets.2022.827702.
5. Martinez-Guijosa J, Romero B, Infantes-Lorenzo JA, Diez E, Boadella M, Balseiro A, Veiga M, Navarro D, Moreno I, Ferreres J, Dominguez M, Fernandez C, Dominguez L and Gortazar C. Environmental DNA: A Promising Factor for Tuberculosis Risk Assessment in Multi-Host Settings. *PLoS ONE*, 15(5):e0233837. 2020. DOI: 10.1371/journal.pone.0233837.
6. Ortega J, Roy A, Alvarez J, Sanchez-Cesteros J, Romero B, Infantes-Lorenzo JA, Saez-Llorente JL, Lopez M, Dominguez L, de Juan L and Bezos J. Effect of the inoculation site of bovine and avian purified protein derivatives (PPDs) on the performance of the intradermal tuberculin test in goats from tuberculosis- free and infected herds. *Frontiers in veterinary science*, 8:722825. 2021a. DOI: 10.3389/fvets.2021.722825.
7. Ortega J, Infantes-Lorenzo JA, Bezos J, Roy A, de Juan L, Romero B, Moreno I, Gómez-Buendía A, Agullo-Ros I, Dominguez L and Dominguez M. Evaluation of the P22 ELISA for the detection of *Mycobacterium bovis*-specific antibodies in oral fluid samples obtained from goats. *Frontiers in veterinary science*, 8:674636. 2021b. DOI: 10.3389/fvets.2021.674636.
8. Ortega J, Infantes-Lorenzo JA, Roy A, de Juan L, Romero B, Moreno I, Dominguez M, Dominguez L and Bezos J. Factors affecting the performance of P22 ELISA for the diagnosis of caprine tuberculosis in milk samples. *Research in Veterinary Science*, 145:40-45. 2022a. DOI: 10.1016/j.rvsc.2022.02.008.
9. Ortega J, Roy A, Díaz-Castillo A, de Juan L, Romero B, Saez-Llorente JL, Dominguez L, Regal P, Infantes-Lorenzo JA, Alvarez J, Bezos J. Effect of the topical administration of corticosteroids and tuberculin pre-sensitisation on the diagnosis of tuberculosis in goats. *BMC Vet Res*, 18(1):58. 2022b. DOI: 10.1186/s12917-022-03156-0.
10. Ortega J, de Juan L Sevilla IA, Garrido J, Roy A, Velasco C, Romero B, Dominguez M, Perez de Val B, Nebot C, Saez-Llorente JL, Alvarez J, Bezos J. Effect of a recent parenteral dexamethasone and ketoprofen administration on the immunological diagnosis of tuberculosis in goats. *Frontiers in Veterinary Science*, in press. 2022c. DOI: 10.3389/fvets.2022.1042428.
11. Picasso-Risso C, Gil A, Nunez A, Suanes A, Macchi V, Salaberry X, Alvarez J, Perez A. Diagnostic interaction between bovine tuberculosis (bTB) and Johne's disease in bTB highly prevalent dairy farms of Uruguay. *Veterinary and Animal Science*, 21;7:100052. 2019. DOI: 10.1016/j.vas.2019.100052.
12. Pozo P, VanderWaal K, Grau A, de la Cruz ML, Nacar J, Bezos J, Perez AM, Minguez O and Alvarez J. Analysis of the cattle movement network and its association with the risk of bovine tuberculosis at the farm level in Castilla y Leon, Spain. *Transboundary and Emerging Diseases*, 66(1):327-340. 2019. DOI: 10.1111/tbed.13025.

13. Pozo P, Romero B, Bezos J, Grau A, Nacar J, Saez-Llorente JL, Minguez O and Alvarez J. Evaluation of Risk Factors Associated With Herds With an Increased Duration of Bovine Tuberculosis Breakdowns in Castilla y Leon, Spain (2010-2017). *Frontiers in veterinary science*, 7:545328. 2020. DOI: 10.3389/fvets.2020.545328.
14. Pozo P, Cespedes-Cardenas N, Bezos J, Romero B, Grau A, Nacar J, Saez-Llorente JL, Minguez O and Alvarez J. Evaluation of the performance of slaughterhouse surveillance for bovine tuberculosis detection in Castilla y Leon, Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 189:105307. 2021. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2021.105307.
15. Pozo P, Lorente-Leal V, Robbe-Austerman S, Hicks J, Stuber T, Bezos J, de Juan L, Saez-Llorente JL, Romero B, Alvarez J and on behalf of the Spanish Network on Surveillance Monitoring of Animal Tuberculosis. Use of Whole-Genome Sequencing to Unravel the Genetic Diversity of a Prevalent *Mycobacterium bovis* Spoligotype in a Multi-Host Scenario in Spain. *Frontiers in Microbiology*, 13:915843. 2022. DOI: 10.3389/fmicb.2022.915843.
16. Roy A, Diez-Guerrier A, Ortega J, de la Cruz ML, Saez-Llorente JL, Dominguez L, de Juan L, Alvarez J and Bezos J. Evaluation of the McIntock syringe as a cause of non-specific reactions in the intradermal tuberculin test used for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science*, 122:175-178. 2019a. DOI: 10.1016/j.rvsc.2018.11.025.
17. Roy A, Tome-Sanchez I, Romero B, Lorente-Leal V, Infantes-Lorenzo JA, Dominguez M, Martin C, Aguilo N, Puentes E, Rodriguez E, de Juan L, Risalde MA, Gortazar C, Dominguez L and Bezos J. Evaluation of the immunogenicity and efficacy of BCG and MTBVAC vaccines using a natural transmission model of tuberculosis. *Veterinary Research*, 50(1):82. 2019b. DOI: 10.1186/s13567-019-0702-7.
18. Ruiz-Cabello J, Sevilla AI, Olaizola E, Bezos J, Miguel-Coello AB, Muñoz-Mendoza M, Beraza M, Garrido JM and Izquierdo-Garcia JL. Benchtop nuclear magnetic resonance-based metabolomic approach for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Transboundary and Emerging Diseases*, 69(4):e859-e870. 2022. DOI: 10.1111/tbed.14365.

Patología Infecciosa Veterinaria de la Universidad de Extremadura (PATIN-UEx)



Javier Hermoso de Mendoza
Salcedo
Luis Jesús Gómez Gordo
David Risco Pérez
Remigio Martínez Pérez

José Manuel Benítez Medina
Natalia Jiménez Pizarro
Rocío Holgado Martín
Laura Zalama Rosa
Estefanía Rosco Pizarro
Hélio Correia

Contacto: Javier Hermoso de Mendoza Salcedo

jhermoso@unex.es

Historia

El grupo de Patología Infecciosa Veterinaria de la Universidad de Extremadura (PATIN-UEx) está constituido por un equipo multidisciplinar de investigadores e investigadoras adscritos al grupo de investigación del Sistema Extremeño de Ciencia, Tecnología e Innovación: grupo S.E.C.T.I. AGA012 "Patología Infecciosa Veterinaria".

Desde una primera descripción de casos de tuberculosis en jabalíes de Monfragüe en 1994, por miembros de nuestro grupo y una primera colaboración en 1996 del doctor Javier Hermoso de Mendoza con el grupo de Biología y Etología de la UEx para la monitorización de la sanidad en especies de caza mayor, el trabajo de nuestro grupo se ha mantenido ininterrumpido, encadenando proyectos competitivos nacionales y regionales y convenios con las Consejerías de Salud Pública inicialmente y desde 2004 con Agricultura y Medio Ambiente, referentes a la tuberculosis, a su monitorización en grandes ungulados

silvestres y en ganadería, y desde 2011 al diseño de estrategias de control en entornos extensivos, con la colaboración de componentes del equipo de Anatomía Patológica del Departamento de Medicina y Cirugía Animal de la UEx integrados en nuestro grupo de investigación, como el doctor Luis Gómez Gordo y del doctor David Risco Pérez, premio internacional Syva 2015 a la mejor Tesis Doctoral en Sanidad Animal.

Desde el grupo se han defendido, además de la tesis del doctor Risco, en la que la tuberculosis era uno de los temas de mayor trascendencia en un contexto de sanidad de especies salvajes, otras cuatro tesis doctorales más con la tuberculosis como tema único. Igualmente se han publicado diversas publicaciones en revistas de impacto, las primeras más bien descriptivas de una realidad que aún pasaba inadvertida a las autoridades de Sanidad Animal, como era la creciente prevalencia de la tuberculosis en especies salvajes con su evidente interferencia con las campañas de saneamiento en áreas de alta densidad de población de grandes ungulados salvajes. También desde los primeros trabajos se ponía de manifiesto, muy especialmente, el papel del jabalí como principal reservorio de tuberculosis en el ecosistema mediterráneo, contra la opinión inicial de algunos expertos europeos que negaban la evidencia, y lo consideraban fondo de saco epidemiológico, equiparándolo con los cerdos asilvestrados australianos. Más tarde pasamos de investigación epidemiológica descriptiva a otra más proactiva, en colaboración estrecha con la administración, orientada a luchar en el campo contra la tuberculosis y a poner de acuerdo en esta lucha a los sectores más directamente afectados e interesados en controlarla: el ganadero y el cinegético. Podemos decir con seguridad que, en esto, Extremadura ha sido pionera en tapar esa brecha aparentemente irreconciliable entre dos sectores, primer paso verdadero para llegar a un control efectivo. Y ese sigue siendo nuestro empeño actual, con líneas de trabajo relacionadas con la potenciación inmunitaria a partir de la mejora nutricional, del uso de posbióticos y del control de agentes patógenos inmunosupresores, que podrían enmascarar respuestas negativas a la tuberculina en los bovinos, y favorecer la entrada y dispersión de la tuberculosis en poblaciones libres.

Avances de la investigación entre 2019-2022

En estos últimos años, la bioseguridad ha sido uno de los ejes fundamentales de los proyectos de nuestro grupo de investigación, pues se ha constatado que todas las explotaciones deben mantener unos niveles de bioseguridad adaptados al riesgo concreto de la propia finca y de la zona en la que esta se ubica. Por ello, uno de los principales objetivos consiste en realizar auditorías de bioseguridad que permitan identificar y evaluar, a través de un protocolo estandarizado, las diferentes fuentes de riesgo con el fin de poder implementar medidas concretas y adaptadas que ayuden a corregir o mejorar una situación de vulnerabilidad.

De hecho, si algo hemos aprendido en estos años, es que debemos alejarnos de implementar recetas genéricas, porque cada finca tiene sus particularidades, y si no se conocen a la perfección antes de diseñar y aplicar una propuesta de medidas preventivas, se corre el riesgo de que no sean todo lo efectivas que sí han podido ser en otras situaciones.

En este sentido, el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación encargó al grupo PATIN-UEx el diseño y transferencia de una App para la realización de las auditorías de bioseguridad que se contemplan para explotaciones de bovino localizadas en comarcas de especial riesgo en el Real Decreto 138/2020. El desarrollo y posterior uso de esta App contribuirá a conseguir que las auditorías de bioseguridad sean una excelente herramienta en la lucha contra la tuberculosis animal.

Con respecto al efecto que producen las coinfecciones en el desarrollo de la tuberculosis, en estos últimos años hemos confirmado mediante experiencias de campo que, la aplicación de medidas sanitarias enfocadas en la reducción del impacto de patógenos

como PCV-2 reduce la gravedad de los cuadros de tuberculosis en jabalí, lo que a la larga puede reducir la excreción de micobacterias y los índices de transmisión de la enfermedad.

Por último, hemos realizado diversos estudios en los que hemos comprobado como la potenciación del sistema inmune mediante la utilización de productos posbióticos derivados de bacterias ácido-lácticas, puede ser una herramienta para limitar el impacto de la tuberculosis en poblaciones de animales domésticos y salvajes. En las primeras experiencias hemos comprobado *in vitro* que los metabolitos derivados de estas bacterias inhiben el crecimiento de *M. bovis* y modula rutas inmunológicas importantes en la acción de células defensivas como los macrófagos. Además, se han realizado las primeras experiencias de campo con el objetivo de confirmar estos resultados obtenidos en el laboratorio. Bioseguridad y efecto de mejoras nutricionales y posbióticos en bovino extensivo, son parte esencial de una tesis doctoral que, dirigida desde nuestro equipo, se realiza en Portugal.

Futuro

En los próximos años se pretenden llevar a cabo nuevos estudios de investigación y concluir algunos iniciados recientemente. Entre las líneas a desarrollar, en colaboración con otros grupos de investigación, se incluyen las siguientes:

- Estudio del efecto inmunológico provocado por agentes inmunosupresores en el desarrollo de la tuberculosis. En concreto estamos desarrollando un proyecto titulado «Valoración cuantitativa de la respuesta inmune expresada por monocitos de jabalíes frente a la tuberculosis en condiciones de manejo mejoradas», cuyo objetivo principal es la evaluación del efecto de la vacunación de PCV2 y la suplementación alimentaria sobre la respuesta inmune mediada por monocitos y macrófagos en la tuberculosis. Para la consecución de este objetivo general se han planteado otros más específicos como:
 - Desarrollo de un modelo *in vitro* de infección por tuberculosis en jabalíes.
 - Expresión de genes de interleucinas por parte de monocitos en jabalíes de campo y en jabalíes con manejo asociado.
 - Correlación de la expresión de citoquinas y la expresión orgánica de la tuberculosis.
- Estudio de la utilidad de la aplicación de posbióticos en la epidemiología de la tuberculosis en animales domésticos y salvajes. En este sentido se están desarrollando experiencias en diferentes especies (jabalí, bovino, caprino) en las que se está evaluando el impacto de la aplicación de estos suplementos en la epidemiología de la tuberculosis en circunstancias reales de campo.

Resumen

Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB			
Campo	Resultado	Aplicación	Referencia
Control	La aplicación de vacunas frente a PCV2 favorece la presencia de cuadros menos graves de TB	Aplicación de programas vacunales frente a PCV2 en cotos de caza con capacidad de manejo de animales y granjas cinegéticas	6
Control	Los metabolitos derivados bacterias ácido-lácticas inhiben el crecimiento de <i>M. bovis</i> y potencia rutas inmunológicas importantes	Administración de suplementos derivados de estas bacterias para potenciar el sistema inmune y mejorar la respuesta frente a <i>M. bovis</i> .	2, 3

Objetivos inmediatos y su beneficio potencial para el control de TB		
Campo	Objetivo	Beneficio
Control	Evaluar el impacto de la aplicación de suplementos posbióticos en el control de la tuberculosis	Reducción de la prevalencia de infecciones por <i>M. bovis</i> en fauna salvaje y animales domésticos.
Bioseguridad	Realización de APP para monitorizar y cuantificar los riesgos de bioseguridad referentes a la tuberculosis en explotaciones extensivas.	Detección de puntos críticos a mejorar en explotaciones de zonas ubicadas en zonas de riesgo de TB.

Publicaciones derivadas

1. Pérez-González, J., Carranza, J., Martínez, R. & Benítez-Medina, J.M. (2021). Host genetic diversity and infectious diseases. Focus on wild boar, red deer and tuberculosis. *Animals*, 11, 1630. <https://doi.org/10.3390/ani11061630>.
2. Bravo, M., Combes, T., Martínez, F., Risco, D., García Jiménez, W., Cerrato, R., Fernández Llarío, P. & Gutierrez Merino, J. (2022). Wildlife Symbiotic Bacteria Are Indicators of the Health Status of the Host and Its Ecosystem. *Applied and Environmental Microbiology*, 88, 1 - 18.
3. Bravo, M., Combes, T., Martínez, F., Cerrato, R., Rey, J., García Jiménez, W., Fernández Llarío, P., Risco, D., & Gutierrez Merino, J. (2019) Lactobacilli Isolated From Wild Boar (*Sus scrofa*) Antagonize *Mycobacterium bovis* Bacille Calmette-Guerin (BCG) in a Species-Dependent Manner. *Frontiers in microbiology*, 1663.
4. Risco, D., Martínez, R., Bravo, M., Fernández Llarío, P., Cerrato, R., García Jiménez, W., Gonçalves, P., Garcia, A., Barquero, O., Quesada, A., Hermoso de Mendoza, J. (2019). Nasal shedding of *Mycobacterium tuberculosis* in wild boar is related to generalised tuberculosis and concomitant infections. *Veterinary Record*, 1 - 5.
5. Risco, D., Gonçalves, P., Bravo, M., García Jiménez, W., Cerrato, R., Hermoso de Mendoza, J., Fernández Llarío, P. (2019). Seasonal and dietary effects on Vitamin D deficiencies detected in wild boar from mid-western Spain. *Journal of animal physiology and animal nutrition*.
6. Risco, D., Bravo, M., Martínez, R., Torres, A., Gonçalves, P., Cuesta, J.M., García-Jiménez, W.L., R; Iglesias, R., Galapero, J., Serrano, E., Gómez, L., Fernández-Llarío, P., Hermoso de Mendoza, J. (2018). Vaccination Against Porcine Circovirus-2 Reduces Severity of Tuberculosis in Wild Boar. *Ecohealth*, 15 - 2, 388 - 395.

Proyectos o contratos financiados

1. **Título del proyecto:** Convenio de Colaboración entre la Consejería de Medio Ambiente y Rural, Políticas Agrarias y Territorio de la Junta de Extremadura y la Universidad de Extremadura (Facultad de Veterinaria) para el desarrollo del proyecto de investigación sobre experiencias de control de la tuberculosis en las especies cinegéticas y ganaderas. 2016- 2020
Entidad financiadora: Junta de Extremadura
Duración: del 30/09/2016 al 31/05/2020
Investigador principal: Javier Hermoso de Mendoza Salcedo
2. **Título del proyecto:** Influencia de enfermedades concomitantes en el desarrollo de la tuberculosis en el jabalí. Propuesta de medidas de lucha (IB16079)
Entidad financiadora: Junta de Extremadura
Duración: del 01/06/2017 al 31/05/2020
Investigador principal: Luis Jesús Gómez Gordo
3. **Título del proyecto:** Convenio de Colaboración entre la Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural, Población y Territorio de la Junta de Extremadura y la Universidad de Extremadura (Facultad de Veterinaria), para el desarrollo del proyecto de investigación sobre la epidemiología de la tuberculosis y brucelosis en ganado extremeño 2020-2021
Entidad financiadora: Junta de Extremadura
Duración: del 02/01/2020 al 23/12/2021
Investigador principal: Javier Hermoso de Mendoza Salcedo
4. **Título del proyecto:** Convenio de Colaboración entre la Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural, Población y Territorio de la Junta de Extremadura y la Universidad de Extremadura (Departamento de Sanidad Animal) para el desarrollo del proyecto de

investigación sobre mejoras en el diagnóstico y la prevención de la tuberculosis en la fauna cinegética y el ganado doméstico. 2020-2023

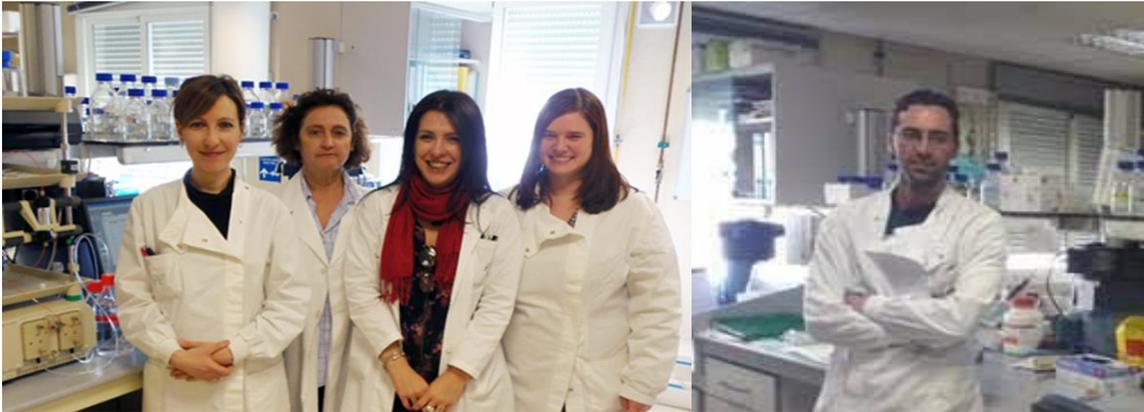
Entidad financiadora: Junta de Extremadura

Duración: del 30/07/2020 al 30/06/2023

Investigador principal: Javier Hermoso de Mendoza Salcedo

5. **Título del proyecto:** Proyecto piloto para apoyo diagnóstico de tuberculosis animal en inspecciones de rutina en matadero
Entidad financiadora: Servicio Extremeño de Salud
Duración: del 01/01/2021 al 31/12/2021
Investigador principal: Luis Jesús Gómez Gordo
6. **Título del proyecto:** Valoración cuantitativa de la respuesta inmune expresada por monocitos de jabalíes frente a la tuberculosis en condiciones de manejo mejoradas (IB20027)
Entidad financiadora: Junta de Extremadura
Duración: del 03/06/2021 al 02/06/2024
Investigador principal: Luis Jesús Gómez Gordo
7. **Título del proyecto:** Diseño y transferencia de una App para la realización de las auditorías de bioseguridad que se contemplan para explotaciones de bovino localizadas en comarcas de especial riesgo en el Real Decreto 138/2020
Entidad financiadora: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
Duración: del 19/07/2021 al 15/12/2021
Investigador principal: Javier Hermoso de Mendoza Salcedo
8. **Título del proyecto:** Convenio de Colaboración entre la Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural, Población y Territorio (Servicio de Sanidad Animal) de la Junta de Extremadura y la Universidad de Extremadura (Departamento de Sanidad Animal) para el desarrollo del proyecto de investigación sobre aspectos etiológicos, epidemiológicos e inmunológicos de la tuberculosis y brucelosis en ganado extremeño, Año 2022-2023
Entidad financiadora: Junta de Extremadura
Duración: del 30/12/2021 al 23/12/2023
Investigador principal: Javier Hermoso de Mendoza Salcedo

Unidad de Inmunología Microbiana (ISCIH)



Mercedes Domínguez Rodríguez
Inmaculada Moreno Iruela
Jose Infantes Lorenzo

Ana Belen Martín Ezquerra
Soledad Crespo Carrasco

Contacto: Mercedes Domínguez Rodríguez

mdominguez@isciii.es

Historia

La Unidad de Inmunología Microbiana del Instituto de Salud Carlos III pertenece al Área de Inmunología del Centro Nacional de Microbiología. Actualmente está integrada por una Investigadora Científica (Jefa de Unidad), dos investigadores seniors y dos técnicos de laboratorio.

Cabe destacar dos aspectos fundamentales de la trayectoria científica del grupo. El primero el orientado al estudio de la interacción del sistema inmune innato con un agente infeccioso, más concretamente el encauzado a la caracterización de los eventos que tienen lugar tras la interacción de *Leishmania* con los componentes séricos (sistema del complemento y anticuerpos naturales) y celulares (neutrófilos y monocitos) de la sangre de mamíferos. La investigación en este campo nos ha permitido establecer alguno de los mecanismos que actúan sobre el curso de la infección. El segundo, es el concerniente a la caracterización inmunoproteómica de antígenos procedentes de agentes infecciosos que, tras su interacción con el sistema inmune de ratón, inducen en este una respuesta humoral, los anticuerpos así generados nos permiten la identificación de epítopos inmunodominantes. Queremos resaltar en este campo los trabajos realizados con la proteína N y S de SARS-CoV 2 y con la PPD_b (*Mycobacterium bovis*). La caracterización antigénica de los componentes mencionados nos ha permitido la puesta a punto de inmunoensayos sensibles y específicos para ser utilizados en el diagnóstico de ambas enfermedades. Todo ello sin excluir que los antígenos identificados puedan llegar a ser utilizados como dianas terapéuticas con capacidad de inducir una respuesta protectora frente a la infección.

Centrándonos en el presente evento, nuestros estudios sobre tuberculosis animal se inician en el año 2017, financiados con un proyecto concedido en la convocatoria Retos-Colaboración del Ministerio de Economía y Competitividad "HACIA EL DIAGNOSTICO DE TERCERA GENERACIÓN PARA LA TUBERCULOSIS BOVINA". Llevamos a cabo una caracterización inmunoproteómica de la PPD_b e identificamos como proteínas inmunodominantes de este producto a MPB70, MPB83, Hsp X y ESAT-6, englobadas todas ellas en un complejo multiproteico al que denominamos P22 (protegido bajo patente europea N^o de solicitud 16382579.7-1412) y que es obtenido rutinariamente en nuestro

laboratorio mediante inmunopurificación con un anticuerpo monoclonal, para posteriormente ser utilizado en el diagnóstico humoral de la tuberculosis animal tanto en nuestro laboratorio como en los de otros grupos de investigación con los que mantenemos colaboraciones.

Avances de la investigación entre 2019-2022

En este periodo nuestro trabajo ha englobado 1º) la optimización de la **obtención** de P22, 2º) estudios de la **estabilidad** del producto y 3º) **suministro** de complejo a otros grupos de trabajo con fines diagnóstico y de investigación. Desde 2018 hemos producido alrededor de 300 mg de P22 a partir de PPD bovina cedida por CZ veterinaria (propietaria de la patente). Con lo que respecta a nuestro laboratorio utilizando la P22 hemos:

- Realizado el diagnóstico en unas 15.000 muestras de animales domésticos (cabra, vaca, cerdo y alpacas) y alrededor de 1.000 procedentes de animales silvestres (jabalíes, cabra montesa, gamos y ciervos).
- En colaboración con el Servicio de Ensayos Clínicos y el Servicio de Micobacterias del Centro Visavet, puesto a punto un método de diagnóstico de detección de anticuerpos específicos frente a *M. bovis* presentes en la leche del ganado caprino.
- Desarrollado un ELISA competitivo, empleando PPDa, para discernir entre anticuerpos específicos frente a *M. bovis* de los que son frente a antígenos de *M. avium* pero compartidos con *M. bovis*.
- En investigación básica hemos llevado a cabo estudios para analizar el efecto inmunomodulador del complejo proteico P22 en tuberculosis y otras enfermedades infecciosas, centrados especialmente en el efecto inmunomodulador en la Leishmaniosis de manera similar al llevado a cabo con la BCG, en colaboración con el grupo Sanidad y Biotecnología del IREC y Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas de la Universidad de Córdoba.

Por último, queremos mencionar nuestra colaboración en el desarrollo de una solución utilizada en muestreos ambientales para detectar la presencia de microorganismos. Esta solución permite inactivar microorganismos lo que permite garantizar la seguridad del manejo de la muestra, el transporte y, su procesamiento posterior sin detrimento de la sensibilidad diagnóstica. Existe una solicitud de patentes para esta solución y el procedimiento (*Solicitud de patente en España nº P202130937: Composición para el muestreo, inactivación de microorganismos y preservación de ácidos nucleicos de muestras ambientales*). Esponjas embebidas en esta solución hidro-alcohólica están siendo empleadas para la detección de material genético de SARS-CoV 2, Peste Porcina Africana y Tuberculosis animal.

Futuro

En un futuro inmediato continuaremos con la producción de P22, lo que permitirá seguir suministrando el complejo a otros grupos de investigación ser utilizada con fines diagnóstico e investigación. Además, se abordará la finalización de los ensayos sobre el efecto inmunomodulador de P22 comparado con el que inducen otros productos derivados de micobacterias en el mecanismo de Inmunidad en un modelo de infección por *Leishmania amazonensis* en ratones BALB/c.

Para concluir, entre nuestros objetivos está el desarrollar un prototipo de método diagnóstico de tuberculosis empleando como base un sistema de Flujo Lateral, donde el antígeno de detección de anticuerpos sea P22. Este sistema permitiría un diagnóstico rápido (alrededor de 15 minutos) y se pretende que sea utilizado para la detección de anticuerpos procedentes de múltiples especies.

Resumen

Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB			
Campo	Resultado	Aplicación	Referencia
Diagnóstico	Establecer nuevos métodos de diagnóstico serológico.	Control y serovigilancia de tuberculosis en fauna silvestre.	3
Diagnóstico	Establecer nuevas matrices para diagnóstico humoral	Emplear muestras menos invasivas como la leche.	10
Diagnóstico	Desarrollo de inmunoensayos competitivos para el diagnóstico humoral	Aumentan la sensibilidad y especificidad en el diagnóstico serológico	
Control	Desarrollo de solución hidro-alcohólica para inactivación de microorganismos y preservación de ácidos nucleicos de muestras ambientales	Vehículo para la realización de muestreos ambientales mediante esponjas impregnadas	15

Objetivos inmediatos y su beneficio potencial para el control de TB		
Campo	Objetivo	Beneficio
Diagnóstico	Desarrollar un prototipo de método diagnóstico de tuberculosis empleando como base un sistema de Flujo Lateral.	Método de diagnóstico rápido y múltiple especie

Publicaciones derivadas

1. Barral, Thiago Doria; Infantes-Lorenzo, Jose A; Moreno, Inmaculada; de Garnica Garcia, M Gracia; de Val, Bernat Perez; Gortazar, Christian; Meyer, Roberto; Portela, Ricardo D; Dominguez, Lucas; Dominguez, Mercedes; Balseiro, Ana. **P22 protein complex in the serodiagnosis of animal tuberculosis: Antigenic stability and cross-reactivity with *Corynebacterium pseudotuberculosis* infection.** Comparative immunology, microbiology and infectious diseases. 90-91, pp. 101891. 07/10/2022. ISSN 1878-1667.
2. Ortega, J.; Infantes-Lorenzo, J. A.; Roy, A.; de Juan, L.; Romero, B.; Moreno, I; Dominguez, M.; Dominguez, L.; Bezos, J. **Factors affecting the performance of P22 ELISA for the diagnosis of caprine tuberculosis in milk samples.** Research In Veterinary Science. 145, pp. 40 – 45. ELSEVIER SCI LTD, 01/07/2022. ISSN 0034-5288, ISSN 1532-2661.
3. Ferreras-Colino E, Moreno I, Arnal MC, Balseiro A, Acevedo P, Domínguez M, Fernández de Luco D, Gortázar C, Risalde MA **Is serology a realistic approach for monitoring red deer tuberculosis in the field?** Prev Vet Med. 2022 May; 202:105612. Doi: 10.1016/j.prevetmed.2022.105612. Epub 2022 Mar 17. PMID: 35339768.
4. Ortega, Javier; Infantes-Lorenzo, Jose A.; Bezos, Javier; Roy, Alvaro; de Juan, Lucia; Romero, Beatriz; Moreno, Inmaculada; Gomez-Buendia, Alberto; Agullo-Ros, Irene; Dominguez, Lucas; Dominguez, Mercedes. **Evaluation of P22 ELISA for the Detection of *Mycobacterium bovis*-Specific Antibody in the Oral Fluid of Goats.** Frontiers In Veterinary Science. 8, FRONTIERS MEDIA SA, 11/08/2021. ISSN 2297-1769.
5. Blanco Vázquez C, Barral TD, Romero B, Queipo M, Merediz I, Quirós P, Armenteros JÁ, Juste R, Domínguez L, Domínguez M, Casais R, Balseiro A. **Spatial and Temporal Distribution of *Mycobacterium tuberculosis* Complex Infection in Eurasian Badger (*Meles meles*) and Cattle in Asturias, Spain.** Animals (Basel). 2021 Apr 30;11(5):1294. Doi: 10.3390/ani11051294.PMID: 33946463
6. Infantes-Lorenzo, J. A.; Romero, B.; Rodriguez-Bertos, A.; Roy, A.; Ortega, J.; de Juan, L.; Moreno, I.; Dominguez, M.; Dominguez, L.; Bezos, J. **Tuberculosis caused by *Mycobacterium caprae* in a camel (*Camelus dromedarius*).** BMC Veterinary Research. 16 – 1, BMC, 10/11/2020. ISSN 1746-6148
7. Arrieta-Villegas, Claudia; Antonio Infantes-Lorenzo, Jose; Bezos, Javier; Grasa, Miriam; Vidal, Enric; Mercader, Irene; Singh, Mahavir; Domingo, Mariano; de Juan, Lucia; Perez de Val, Bernat. **Evaluation of P22 Antigenic Complex for the Immuno-Diagnosis of Tuberculosis in BCG Vaccinated and Unvaccinated Goats.** Frontiers In Veterinary Science. 7, FRONTIERS MEDIA SA, 03/07/2020. ISSN 2297-1769
8. Antonio Infantes-Lorenzo, Jose; Gortazar, Christian; Dominguez, Lucas; Munoz-Mendoza, Marta; Dominguez, Mercedes; Balseiro, Ana. **Serological technique for detecting tuberculosis prevalence in sheep in Atlantic Spain.** Research In Veterinary Science. 129, pp. 96 – 98. ELSEVIER SCI LTD, 01/04/2020. ISSN 0034-5288, ISSN 1532-2661
9. Balseiro, Ana; Prieto, Jose Miguel; Alvarez, Vega; Lesellier, Sandrine; Dave, Dipesh; Salguero, Francisco J.; Sevilla, Iker A.; Infantes-Lorenzo, Jose Antonio; Garrido, Joseba M.; Adriaensen, Hans; Juste, Ramon A.; Barral, Marta. **Protective Effect of Oral BCG and Inactivated *Mycobacterium bovis* Vaccines in European Badgers (*Meles meles*) Experimentally Infected with *M. bovis*.** Frontiers In Veterinary Science. 7, FRONTIERS MEDIA SA, 04/02/2020. ISSN 2297-1769
10. Roy, A.; Infantes-Lorenzo, J. A.; Dominguez, M.; Moreno, I.; Perez, M.; Garcia, N.; Garcia-Seco, T.; Alvarez, J.; Romero, B.; Gortazar, C.; de Juan, L.; Dominguez, L.; Bezos, J. **Evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of**

- tuberculosis in goat milk.** Research In Veterinary Science. 128, pp. 217 – 223. ELSEVIER SCI LTD, 01/02/2020. ISSN 0034-5288, ISSN 1532-2661
11. Infantes-Lorenzo, J. A.; Moreno, I.; Roy, A.; Risalde, M. A.; Balseiro, A.; de Juan, L.; Romero, B.; Bezos, J.; Puentes, E.; Akerstedt, J.; Tessema, G. T.; Gortazar, C.; Dominguez, L.; Dominguez, M. **Specificity of serological test for detection of tuberculosis in cattle, goats, sheep and pigs under different epidemiological situations.** BMC VETERINARY RESEARCH. 15, BMC, 01/03/2019. ISSN 1746-6148
 12. Infantes-Lorenzo, Jose A.; Dave, Dipesh; Moreno, Immaculada; Anderson, Paul; Lesellier, Sandrine; Gormley, Eamonn; Dominguez, Lucas; Balseiro, Ana; Gortazar, Christian; Dominguez, Mercedes; Salguero, Francisco J. **New serological platform for detecting antibodies against *Mycobacterium tuberculosis* complex in European badgers.** Veterinary Medicine and Science. 5 – 1, pp. 61 – 69. WILEY, 01/02/2019. ISSN 2053-1095
 13. Thomas, J.; Infantes-Lorenzo, J. A.; Moreno, I.; Romero, B.; Garrido, J. M.; Juste, R.; Dominguez, M.; Dominguez, L.; Gortazar, C.; Risalde, M. A. **A new test to detect antibodies against *Mycobacterium tuberculosis* complex in red deer serum.** VETERINARY JOURNAL. 244, pp. 98 – 103. ELSEVIER SCI LTD, 01/02/2019. ISSN 1090-0233, ISSN 1532-2971
 14. Thomas, Jobin; Infantes-Lorenzo, Jose A.; Moreno, Immaculada; Cano-Terriza, David; de Juan, Lucia; Garcia-Bocanegra, Ignacio; Dominguez, Lucas; Dominguez, Mercedes; Gortazar, Christian; Risalde, Maria A. **Validation of a new serological assay for the identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex-specific antibodies in pigs and wild boar.** PREVENTIVE VETERINARY MEDICINE. 162, pp. 11 – 17. ELSEVIER SCIENCE BV, 01/01/2019. ISSN 0167-5877, ISSN 1873-1716
 15. Martínez-Guijosa J, Romero B, Infantes-Lorenzo JA, Díez E, Boadella M, Balseiro A, Veiga M, Navarro D, Moreno I, Ferreres J, Domínguez M, Fernández C, Domínguez L, Gortázar C **Environmental DNA: A promising factor for tuberculosis risk assessment in multi-host settings.** PloS One. 2020 May 29;15(5):e0233837. Doi: 10.1371/journal.pone.0233837. eCollection 2020.PMID: 32470035.

Proyectos o contratos financiados

1. **Título del proyecto:** Desarrollo de herramientas diagnósticas innovadoras para el diagnóstico de la tuberculosis en el ganado
Entidad financiadora: Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria
Duración: 2016-2018
Investigador principal: Lucia de Juan
2. **Título del proyecto:** Inmunidad inespecífica asociada a micobacterias inactivadas: rango de patógenos, especificidad del inmunógeno y mecanismos moleculares implicados
Entidad financiadora: Universidad de Castilla la Mancha
Duración: 2020-2023
Investigador principal: Christian Gortázar
3. **Título del proyecto:** Protección y eficacia terapéutica del complejo P22 frente a la tuberculosis caprina: inmunogenicidad y mecanismos moleculares implicados.
Entidad financiadora: Universidad de Córdoba
Investigador principal: M^a Angeles Risalde

Landscape Epidemiology and Wildlife Diseases, Centre for Ecology, Evolution and Environmental Changes (ce3c) Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa



Mónica V. Cunha
Ana C. Reis
André C. Pereira
Beatriz Ramos
Daniela Pinto

Gonçalo Themudo
Inês Natal
Patrícia Lopes
Sara Teixeira

Contacto: Mónica V. Cunha

mscunha@fc.ul.pt

<https://ce3c.ciencias.ulisboa.pt/sub-team/landscape-epidemiology-and-wildlife-diseases>

Historia

O grupo de investigação *Landscape Epidemiology and Wildlife Diseases* é liderado por Mónica V. Cunha, atualmente professora da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa e investigadora do Centre for Ecology, Evolution and Environmental Changes (ce3c). Mónica V. Cunha iniciou a sua atividade de investigação em tuberculose animal enquanto investigadora do Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, IP (2009-2015 e 2017-2020), com o qual colabora com regularidade.

O grupo de investigação é constituído por uma equipa multidisciplinar de investigadores, estudantes de doutoramento e estudantes de mestrado, e tem como missão desenvolver investigação transdisciplinar e translacional em agentes transmissíveis na interface Homem-animal-ambiente para a resiliência sanitária num contexto de alterações globais.

Concentramo-nos numa vasta gama de microrganismos e parasitas modelo que circulam em sistemas multi-hospedeiro (por exemplo, *Mycobacterium bovis* e *M. caprae*, SARS-CoV-2, *Staphylococcus aureus*, enterobactérias, arbovírus e endoparasitas). Desenvolvemos abordagens inovadoras e integramos ferramentas microbiológicas, moleculares, genómicas, eco-epidemiológicas e computacionais para avançar o conhecimento sobre a dinâmica de transmissão e evolução de agentes patogénicos, e de determinantes de resistência, com enfoque na perspetiva translacional para o apoio à decisão e o desenho de novas intervenções em saúde pública e saúde animal.

Na área da tuberculose animal, o nosso grupo de investigação tem centrado os estudos científicos nos hospedeiros de grande relevância epidemiológica na Península Ibérica (bovinos [*Bos taurus*], javali [*Sus scrofa*] e o veado [*Cervus elaphus*]). Temos desenvolvido múltiplos esforços com o objetivo de reforçar o conhecimento sobre a epidemiologia da TB animal na área epidemiológica de risco (edital nº 1/2011 da DGAV), nomeadamente através da caracterização molecular dos agentes etiológicos e da sua dinâmica espaciotemporal, e desenvolvendo abordagens inovadoras para o conhecimento da componente indireta de transmissão via ambiente. Lançámos as bases em Portugal para a vigilância genómica de *M. bovis* e evidenciamos que a compreensão da epidemiologia e controlo da TB pode beneficiar grandemente de dados genéticos e genómicos. Mostramos também que inferências filodinâmicas e filogeográficas de base Bayesiana podem contribuir grandemente para aferir a contribuição de diferentes hospedeiros na manutenção da TB em diferentes áreas. O conhecimento gerado pelo nosso grupo tem elevado potencial para informar novas medidas de controlo sanitário.

Avances de la investigación entre 2019-2022

A TB animal é mantida em Portugal num sistema multi-hospedeiro, com a circulação de *M. bovis* e *M. caprae* em ungulados domésticos (bovinos e caprinos) e ungulados silvestres (veados, javalis). Recentemente, em colaboração com o INIAV, caracterizámos 55 isolados de *M. caprae* provenientes de quatro espécies hospedeiras (bovinos, caprinos, ovinos, javalis), de diversas regiões de Portugal continental e Açores, através de técnicas de genotipagem clássica [spoligotyping e MIRU-VNTR]. Apesar de apenas se detetar um spoligotipo, este trabalho revelou, através de MIRU-VNTR, a variabilidade genética de *M. caprae* e a sua estrutura clonal. A análise da estrutura populacional agrupou os isolados em três complexos clonais (CC1-CC3), com evidências de associações geográficas e a associação entre o CC3 e bovinos. A análise detalhada de três regiões (Bragança, Évora e Beja) evidenciou a ocorrência de surtos separados temporalmente, causados por *M. caprae* pertencente ao CC1, a CC2 e CC3. À luz da literatura disponível, este foi o primeiro trabalho que demonstrou que a infeção policlonal com *M. caprae* é frequente, o que foi confirmado através da deteção de alelos duplos num dos marcadores moleculares (MIRU4). Os isolados de *M. caprae* recuperados em Portugal foram recentemente submetidos a sequenciação completa do genoma (WGS, tecnologia Illumina) com o objetivo de investigar a dinâmica de transmissão deste ecovar num contexto local e num contexto global. Em primeiro lugar, examinámos o posicionamento dos nossos isolados no contexto da diversidade mundial de *M. caprae* usando sequências não publicadas e publicamente disponíveis (n=177 isolados), destacando-se os clades asiático, centro-europeu e ibérico. O clade ibérico engloba exclusivamente isolados de bovinos e fauna selvagem de Portugal e Espanha. Análises filodinâmicas do clade Ibérico de *M. caprae* exibindo sinal temporal posicionaram o ancestral comum mais recente (MRCA) em caprinos de Espanha, há mais de 170 anos. Os eventos de transição de *M. caprae* de cabras para bovinos e javali são especialmente comuns nalgumas regiões, possivelmente resultantes do manejo em explorações mistas de regime extensivo, facilitando a interação interespecífica. As transições intra-regionais foram os eventos de transição mais comuns (78%), possivelmente relacionados com o intenso

comércio de raças de pequenos ruminantes entre rebanhos a nível local. Foram também detetadas três transições transnacionais entre Portugal e Espanha.

Relativamente ao trabalho desenvolvido em *M. bovis*, realizou-se a caracterização molecular (spoligotyping e MIRU-VNTR) de 948 isolados do INIAV, provenientes entre 2003 e 2015 dos hospedeiros de grande relevância epidemiológica nas regiões hotspot em Portugal (distritos de Castelo Branco, Portalegre e Beja). A análise espaciotemporal e probabilística identificou dois clusters, o mais antigo (2004-2010) com centro em Barrancos (Beja) e o mais recente (2012-2016) com centro no Rosmaninhal (Castelo Branco). No cluster mais antigo, o maior risco relativo foi atribuído aos bovinos, enquanto no cluster mais recente foi atribuído às espécies silvestres, o que poderá estar relacionado com uma maior amostragem destas espécies naquela área, mas também evidencia a sua crescente importância na dinâmica de transmissão. Os dados de caracterização molecular evidenciaram a elevada diversidade de estirpes existente em Portugal, com a identificação de 64 perfis de spoligotyping e 157 perfis MIRU-VNTR. Estes dados, quando integrados numa análise estatística Bayesiana, permitiram a identificação de cinco populações ancestrais, com alguma especificidade geográfica e tropismo por espécies hospedeiras. As populações de *M. bovis* oriundas de Castelo Branco e Portalegre evidenciam sinais de expansão, fornecendo pistas para intervenções direcionadas ao nível geográfico e do hospedeiro. A caracterização molecular de *M. bovis* proveniente de diferentes cenários epidemiológicos e contextos espaciotemporais suporta a ocorrência de episódios de transmissão intra e interespecífica, quer à escala da exploração, quer à escala da zona de caça. Estes dados reforçam o papel da movimentação animal e do contacto entre domésticos e silvestres, bem como da contaminação ambiental, na transmissão deste agente patogénico, reforçando a importância da vigilância nas explorações e de medidas de biossegurança que limitem o contacto na interface domésticos-silvestre.

Tendo em vista a reconstrução mais fina dos eventos de transmissão, implementou-se a vigilância genómica de *M. bovis*, procedendo-se, numa primeira fase, à sequenciação total de genomas de 44 isolados representativos da diversidade genética encontrada. Esta abordagem confirmou a predominância do complexo clonal Europeu 2 (Eu2). As filogenias baseadas em SNP apoiam a ramificação desta população de *M. bovis* em cinco clades genéticos, bem como o estabelecimento de um catálogo de SNPs específico para cada clade, que poderão ser explorados no futuro como marcadores filogenéticos. A caracterização do perfil de SNPs permitiu reconstruir redes de transmissão locais nas regiões de Castelo Branco e Portalegre. Foi possível identificar ligações com menos de três SNPs de diferença entre isolados da mesma espécie e de espécies distintas, suportando a transmissão intra- e interespecífica e reforçando a importância das espécies silvestres como reservatório. Recentemente expandimos a análise filogenética de 44 para 170 isolados obtidos entre 2002-2018. As filogenias baseadas em SNP apoiam a ramificação da população de *M. bovis* em vários clades, sendo os complexos clonais Eu2 (73%) e Eu3 (25%) os mais representativos. A análise da distância genética baseada em SNPs destacou as redes locais, sugerindo a circulação natural de *M. bovis* durante um longo período de tempo e a ocorrência de eventos de (re)introdução num contexto de transmissão multi-hospedeiro, com barreiras geográficas ineficazes na contenção da disseminação. A análise de clusters ecológicos sugere eventos de transição a partir de áreas com temperaturas médias anuais mais elevadas para aquelas com temperaturas médias anuais mais baixas e expansão de áreas agrícolas para áreas com cobertura florestal mais elevada.

Concentrámo-nos nos isolados do complexo Eu3 através de abordagens filodinâmicas para descobrir cadeias de transmissão locais e estimar parâmetros evolutivos. As análises dos genomas Eu3 revelaram uma taxa evolutiva média de 0,2 substituições/genoma/ano, posicionando o MRCA há 27 anos atrás. Encontramos também evidência da diversificação do complexo clonal Eu3 na área de estudo. A transmissão intra

e interespecífica ocorre com elevada probabilidade, sugerindo a infeção inicial em bovinos com subsequentes eventos de transição deste hospedeiro para os animais selvagens. A inferência filogeográfica revelou que o MRCA infetou hospedeiros no distrito de Portalegre, com subsequentes eventos de transmissão para o distrito de Castelo Branco. Esta é a primeira análise filodinâmica dos isolados Eu3 para estudar as vias de transmissão da tuberculose animal na Península Ibérica.

Em paralelo, desenvolvemos abordagens de resgate de DNA de *M. bovis* obtido de amostras de arquivo, tendo estabelecido os passos chave para a geração e interpretação de dados robustos de WGS. De facto, a utilização de DNA arquivado resultante da vigilância oficial de rotina representa três grandes desafios: baixa concentração, contaminação com DNA de outros organismos e co-ocorrência de mais do que uma estirpe de *M. bovis* por amostra (infeção mista). A perda do genoma de um isolado é um elo perdido na reconstrução da cadeia de transmissão, dificultando a interpretação biológica e epidemiológica dos dados como um todo. Após identificação destes desafios, implementámos uma solução integrada, baseada numa estratégia de amplificação de todo o genoma (WGA), seguida de WGS e abordagem computacional integrada, para minimizar o impacto de amostras de processadas atendendo apenas aos requisitos do diagnóstico oficial, e recuperando assim o maior número possível de genomas com interesse para inferências filodinâmicas. O protocolo por nós desenvolvido permite ligar estreitamente o diagnóstico microbiológico à análise genómica para inclusão em programas de vigilância epidemiológica, sendo útil para outros laboratórios nesta área de atuação.

Pensa-se que a persistência ambiental de *M. bovis* excretado por hospedeiros infetados pode ser responsável pela via indireta de transmissão. Apesar de ter sido demonstrado por vários grupos de investigação a presença de DNA ambiental, restrições metodológicas relacionadas com a dificuldade de isolamento de *M. bovis* a partir de matrizes ambientais impedem a avaliação da sua viabilidade no ambiente e a caracterização da sua assinatura molecular, bem como o estabelecimento de relações filogenéticas entre os isolados ambientais e clínicos. O nosso grupo de investigação desenvolveu recentemente uma abordagem inovadora, modular, e altamente eficiente, baseada em tecnologia *single cell* que explora a citometria de fluxo (FLOW) acoplada a hibridação *in situ* de fluorescência (FISH) e *sorting* de células marcadas com fluorescência (FACS), com o objetivo de identificar, diferenciar, quantificar, e separar células ambientais de *Mycobacterium bovis* de amostras ambientais. A aplicação desta metodologia a células viáveis metabolicamente ativas e a células dormentes foi testada e validada através da infeção experimental de matrizes ambientais (água e solo). Esta metodologia representa um grande avanço na investigação em tuberculose animal, uma vez que permite a identificação taxonómica, diferenciação e quantificação de células de *M. bovis* a partir de amostras complexas de água e sedimentos.

No seguimento do desenvolvimento desta metodologia, recolhemos recentemente amostras ambientais na área epidemiológica de risco de TB em Portugal. Várias matrizes (água, lodo e sedimentos) foram recuperadas de pontos de agregação de mamíferos, nomeadamente charcas e alimentadores artificiais. A metodologia brevemente descrita acima foi aplicada a estas amostras ambientais com o objetivo de detetar e quantificar *M. bovis* nestes micro-habitats e relacionar os seus genomas com os genomas de isolados de *M. bovis* obtidos de bovinos, javalis e veados na mesma região. Este trabalho encontra-se em curso e os resultados obtidos à data serão apresentados neste workshop, no contexto de uma comunicação convidada.

Por fim, temos utilizado abordagens de genómica comparativa com o objetivo de compreender as forças evolutivas que concorrem para moldar a composição e diversidade genómica de *M. bovis*. A análise de pan-genoma evidencia a diversidade genómica das

estirpes de campo e sugere uma estrutura não conservada. A reconstrução ancestral evidenciou uma perda global de genes maior do que o ganho de genes. Outras forças evolutivas que podem moldar a evolução, virulência e função de *M. bovis* foram testadas. Duas abordagens complementares confirmaram três eventos de recombinação, afetando os genes *pks12*, *narX* e *rrs*. Examinou-se com detalhe as mutações presentes em mais de 400 genes associados à virulência. A maioria dos SNPs identificados é não-sinónima, verificando-se um rácio entre alterações não-sinónimas e sinónimas superior a um, o que sugere seleção positiva. Os genes da família *esx* associados à virulência exibiram as taxas de mutação mais elevadas.

Futuro

Pretendemos consolidar o nosso trabalho em vigilância genómica de isolados de campo e otimizar abordagens metodológicas para a vigilância genómica ambiental em zonas contaminadas com *M. bovis*. Pretendemos ainda otimizar o quadro mecanístico para inferências filodinâmicas e filogeográficas que possam suportar a decisão. Vamos também explorar abordagens de *machine learning* para a identificação de variáveis explicativas da prevalência da TB nos animais e ambiente amostrados, projetando o risco espacial para além das áreas de estudo e descrevendo as principais variáveis eco-epidemiológicas que afectam a prevalência e o risco. Serão usadas abordagens de modelação mecanística de aplicação progressiva (modelos ordinários-diferenciais e modelos baseados em agentes). Esta estrutura integrada de modelação servirá de base para a análise de sensibilidade de potenciais cenários de gestão e intervenção que levarão em consideração fatores individuais (por exemplo, movimento), variabilidade natural do sistema biológico e incerteza nos parâmetros estimados. Pretendemos também explorar as assinaturas genómicas de *M. bovis* na adaptação a micronichos em Portugal e validar SNPs para diagnóstico.

Um outro aspecto da nossa investigação futura prende-se com a investigação da ocorrência de infeções fágicas em *M. bovis*. Neste contexto iremos explorar os mais de 200 genomas de isolados portugueses da zona de focos de tuberculose animal entre 2002 e 2021, uma vez que sendo uma amostra filogeneticamente e geograficamente bastante relacionada, são uma amostra valiosa para este tipo de análise. Assim, iremos pesquisar a presença de novos profagos nestes isolados assim como evidências de infeções recentes através da análise de sequências espaçadoras nos *arrays* de CRISPR. Evidência da coexistência de *M. bovis* e micobacteriofagos no ambiente será investigada nas amostras ambientais recolhidas na mesma zona geográfica através de métodos moleculares e de isolamento.

Resumen

Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB			
Campo	Resultado	Aplicación	Referencia
Diagnóstico	Desenvolvimento, otimização, e validação de metodologia baseada em citometria de fluxo (FLOW), hibridação in situ de fluorescência (FISH), e separação de células marcadas com fluorescência (FACS)	Diagnóstico em amostras ambientais Biossegurança	2
Epidemiología	Investigação de surtos e identificação de reservatórios	Revisão de medidas de controlo em exploração e zonas de caça	12, 13 3 artigos em preparação
Epidemiología	Desenvolvimento de estratégias de recuperação de amostras de DNA provenientes do diagnóstico microbiológico para sequenciação de genomas	Acoplamento da genómica ao diagnóstico microbiológico para vigilância genómica regular	Em preparação

Objetivos inmediatos y su beneficio potencial para el control de TB		
Campo	Objetivo	Beneficio
Diagnóstico	Isolamento e caracterização filogenética de <i>M. bovis</i> ambiental	Incorporar e quantificar a contribuição de múltiplas fontes ambientais na transmissão indireta de <i>M. bovis</i>
Diagnóstico	Deteção e quantificação de <i>M. bovis</i> ambiental	Implementação de medidas de biossegurança
Epidemiología	Inferir cadeias de transmissão a multiplas escalas com base em filodinâmica, filogeografia e clusters ecológicos	Compreender, incorporar e quantificar a contribuição de múltiplas fontes na dinâmica de transmissão de <i>M. bovis</i>
Diagnóstico	Facilitar a implementação de rotina de vigilancia epidemiológica baseada em genómica	Implementação da informação fornecida pelos dados genómicos nas estratégias nacionais de controlo da TB animal

Publicaciones derivadas

1. Pereira, A.C., Tenreiro, A., Tenreiro, R., & Cunha, V. M. (2022). Stalking *Mycobacterium bovis* in the total environment: FLOW-FISH & FACS to detect, quantify, and sort metabolically active and quiescent cells in complex matrices. *Journal of Hazardous Materials* 432, 128687. doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128687.
2. Pereira, A.C., Tenreiro, A., Tenreiro, R., & Cunha, M.V. (2022). When FLOW-FISH met FACS: Combining multiparametric, dynamic approaches for microbial single-cell research in the total environment. *Science of The Total Environment* 806(2), 150682. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150682.
3. Reis, A.C., & Cunha, M.V. (2021). The open pan-genome architecture and virulence landscape of *Mycobacterium bovis*. *Microbial Genomics* 7, 10. doi.org/10.1099/mgen.0.000664.
4. Reis, A.C., Salvador, L.C.M., Robbe-Austerman, S., Tenreiro, R., Botelho, A., Albuquerque, T., & Cunha M.V. (2021) Whole Genome Sequencing refines knowledge on the population structure of *Mycobacterium bovis* from a Multi-Host Tuberculosis System. *Microorganisms* 9(8), 1595. doi.org/10.3390/microorganisms9081585.
5. Reis, A.C., & Cunha, M.V. (2021) Genome-wide estimation of recombination, mutation and positive selection enlightens diversification drivers of *Mycobacterium bovis*. *Scientific reports* 11(1): 1-16. doi.org/10.1038/s41598-021-98226-y.
6. Reis, A.C., Tenreiro, R., Albuquerque T, Botelho, A. & Cunha, M.V. (2021) Long-term molecular surveillance provides clues on a cattle origin for *Mycobacterium bovis* in Portugal. *Scientific reports* 10, 20856. doi.org/10.1038/s41598-020-77713-8.
7. Reis, A.C., Ramos, B., Pereira, A.C., & Cunha, M.V. (2021) The hard numbers of tuberculosis epidemiology in wildlife: A meta-regression and systematic review. *Transboundary and Emerging Diseases* 68 (6), 3257-3276. doi.org/10.1111/tbed.13948.
8. Reis, A.C., Ramos, B., Pereira A.C., & Cunha, M.V. (2021) Global trends of epidemiological research in livestock tuberculosis for the last four decades. *Transboundary and Emerging Diseases* 68 (2): 333-346. doi.org/ 10.1111/tbed.13763.
9. Reis, A.C., Salvador L.C.M., Robbe-Austerman S., Tenreiro, R., Botelho, A., Albuquerque T., & Cunha, M.V. (2021) Whole Genome Sequencing Refines Knowledge on the Population Structure of *Mocobacterium bovis* from a multi-host Tuberculosis System. *Microorganisms* 9 (8): 1585. doi.org/ 10.3390/microorganisms9081585.
10. Ramos, B., Pereira, A.C., Reis, A.C. & Cunha, M.V. (2020) Estimates of the global and continental burden of animal tuberculosis in key livestock species worldwide: A meta-analysis study. *One Health* 10: 100169. doi.org/ 10.1016/j.onehlt.2020.100169.
11. Pereira, A.C., Ramos, B. Reis, A.C., & Cunha, M.V. (2020) Non-tuberculous mycobacteria: molecular and physiological bases of virulence and adaptation to ecological niches. *Microorganisms* 8 (9): 1380. doi.org/ 10.3390/microorganisms8091380.
12. Pereira, A.C., Reis, A.C., Ramos, B., & Cunha, M.V. (2020) Animal tuberculosis: Impact of disease heterogeneity in transmission, diagnosis and control. *Transboundary and Emerging Diseases* 67 (5): 1828-1846. doi.org/ 10.1111/tbed.13539.
13. Reis, A.C., Albuquerque, T., Botelho, A. & Cunha, M.V. (2020) Polyclonal infection as a new scenario in *Mycobacterium caprae* epidemiology. *Veterinary microbiology* 240: 108533. doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.108533.

Proyectos o contratos financiados

1. **Título del proyecto:** Colossus: Controlo de tuberculose na interface bovinos-fauna silvestre com recurso a soluções inovadoras inspiradas na natureza

Entidad financiadora: Fundação para a Ciência e a Tecnologia, I.P./MCTES através de fundos nacionais (PIDDAC) e cofinanciado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) da União Europeia, através do Programa Operacional Regional de Lisboa e Programa Operacional Competitividade e Internacionalização do Portugal 2020.

Duración: 36 meses

Investigador principal: Mónica Vieira Cunha

MESA REDONDA I

Moderador: Sr. D. José Luis Sáez



Gestión de la TB desde el punto de vista de los servicios veterinarios

Alberto A. Díez Guerrier

Representante ADS

Maeva Servet, SL
Visavet (UCM)

aadiez@ucm.es

El trabajo de saneamiento ganadero ha sido tradicionalmente minusvalorado y escasamente comprendido por el sector. En los últimos años, la mayor profesionalización de los equipos de campo y el incremento en la información al sector se ha traducido en una mejora en la ejecución de las técnicas diagnósticas con evidentes resultados en la lucha frente a la enfermedad.

Desde la perspectiva de los equipos de campo, se describen a continuación los principales problemas. La mayoría de los aspectos reseñados son comunes a todos los veterinarios que realizan las pruebas diagnósticas, independientemente de su adscripción (ADSG, empresa, libres, directorio...), aclarando que deben considerarse como problemas frecuentes, no generalizables, existiendo diferencias entre profesionales, explotaciones ganaderas o regiones.

Se muestra lo percibido tanto en el trabajo habitual de saneamiento como en las reuniones con otros veterinarios o los cursos de formación en tuberculosis bovina.

- Sensación de cansancio, desmotivación, especialmente en zonas de media/alta prevalencia. En zonas libres o de baja prevalencia, relajación. Falta de implicación del sector, lo que equivale a una “lucha” diaria. Escasa valoración del trabajo de saneamiento.
- Pese a lo avanzado en los cursos de formación se mantienen lagunas en cuanto a la enfermedad y las técnicas diagnósticas, concretamente en cuanto especificidad de las mismas. Muy ligado a la falta de confirmación en animales reaccionantes, lo que puede conllevar cierta relajación en la interpretación, especialmente en reacciones dudosas. No siempre ha existido uniformidad en la información por parte de investigadores/docentes.
- Deficiencias en las instalaciones de manejo que imposibilitan una correcta ejecución de las técnicas diagnósticas o implican asumir riesgos personales.
- Sistema de inspecciones mejorable, siendo el aspecto más criticado el escaso conocimiento práctico por parte de inspectores. Mayor presión sobre veterinarios problemáticos.
- Carga de trabajo/compensación económica. En veterinarios de empresa es frecuente una importante carga diaria de trabajo incompatible con una adecuada

ejecución de la técnica diagnóstica, especialmente el día de la lectura. En el caso de ADSG, las bajas compensaciones económicas hacen cada vez menos atractivo el realizar las pruebas diagnósticas y la implicación que conlleva. Necesidad de realizar pagos directos a veterinarios por trabajos de saneamiento sin pasar por control de ganaderos.

- Fallos en los canales de comunicación con los SVO, no se recibe información tras detectar animales reaccionantes. En ocasiones, sensación de abandono o falta de apoyo ante los ganaderos.
- En los últimos años, coincidiendo con la opinión del sector, generalización en culpabilizar a la fauna silvestre como origen del problema de la Tb, obviando otras fuentes de contagio o relajación en medidas generales de control y bioseguridad.
- A nivel de explotación, esfuerzos concentrados en pruebas diagnósticas sin paralelismo en control y medidas preventivas.

Reseñar que se ha evolucionado favorablemente en la mayoría de estos puntos, salvo el factor económico.

Respecto a la controversia entre realización de pruebas diagnósticas por veterinarios de ADS o de explotación frente a SVO o veterinarios de empresa, en el primer caso puede existir conflicto de intereses si bien es el profesional que mejor conoce la explotación y más indicado para realizar una intervención de tipo global incluyendo, además de diagnóstico, seguimiento, prevención y bioseguridad. En el caso de empresas es más fácil fijar unas directrices por parte de los SVO y ejercer medidas de control. Por lo tanto, ambas opciones presentan ventajas. Personalmente la experiencia me indica que la clave está en la profesionalidad y formación del veterinario, independientemente de su filiación laboral.

Gestão da Tuberculose Bovina do ponto de vista dos serviços veterinários regionais em Portugal

Ana Sofia Campos¹, Maria José Calixto¹, Cristina Mira Ferreira de Sousa²,
Maria José Vallejo de Carvalho², Sílvia Marques³, Joana Godinho⁴

Direção Geral de Alimentação e Veterinária –

¹ Direção de Serviços de Alimentação e Veterinária da Região (DSAVR) do Centro.

² DSAVR do Alentejo.

³ DSAVR do Norte.

⁴ DSAVR de Lisboa e Vale do Tejo.

anasofia.campos@dgav.pt

Introdução

A tuberculose bovina é uma doença infectocontagiosa, naturalmente transmissível dos animais ao Homem e que faz parte da lista de doenças de declaração obrigatória nacional desde 1953 e da lista de doenças notificáveis à Organização Mundial de Saúde Animal (OMSA).

Além das perdas económicas dos estabelecimentos e países afetados pela Tuberculose, fruto das limitações consequentemente impostas à livre circulação dos seus produtos, sendo esta doença uma zoonose assume especial relevância a necessidade e a importância da sua erradicação. A estratégia para o combate à tuberculose bovina baseia-se assim essencialmente em 3 aspetos: a vigilância ativa, a contenção da disseminação e a eliminação dos focos.

Em Portugal os serviços veterinários oficiais estão integrados no ministério da Agricultura e Alimentação com uma orgânica de verticalização em que 5 Direções de Serviços Regionais estão integrados na Direção Geral de Alimentação e Veterinária, sendo que no âmbito da sanidade animal os serviços regionais articulam com a DSPA-Direção de Serviços de Proteção Animal (serviços centrais).

O sucesso deste combate depende de uma boa articulação entre as partes interessadas: Serviços Oficiais aos níveis central e regional e os inspetores sanitários, as Organizações de Produtores para a Sanidade Animal (OPSA) e os produtores e Médicos Veterinários dessas organizações. A sinergia entre os atores envolvidos depende da existência de uma intercomunicação objetiva e coerente e de um acompanhamento próximo e capaz de gerar confiança. Cabe aos Serviços Oficiais desenvolver e gerir o plano de erradicação, implementar as medidas sanitárias adequadas e classificar os estabelecimentos e as áreas, e aos Produtores e seus Médicos Veterinários cumprir o plano e notificar as suspeitas desta doença.

Apesar da taxa de prevalência nacional ter sido em 2021 de 0,38%, esta varia nas Regiões sendo, por ordem crescente de 0,07% na DSAVR Lisboa e Vale do Tejo; 0,09 na

DSAVR Norte, 0,31% na DSAVR Centro e de 1,38% na DSAVR Alentejo. Verifica-se assim a persistência da infeção em zonas bem identificadas, algumas vizinhas da Comunidade Autónoma da Estremadura. Estas zonas raianas estão incluídas em duas Direções de Serviço: a do Centro e a do Alentejo que apresentam indicadores superiores à média nacional. Têm sido identificados alguns fatores que limitam o progresso da erradicação em zonas restritas do país e tem sido reforçada a intervenção dos Serviços Oficiais no sentido de mitigar esses fatores.

Entre os pontos fracos contamos com (i) a dificuldade de envolver e sensibilizar alguns produtores, como responsáveis pela saúde animal e pela mitigação do risco de propagação de doenças, para a importância e retorno económico que representa a erradicação da tuberculose, tornando-os cooperantes com os serviços oficiais e com os médicos veterinários assistentes da exploração; (ii) a dificuldade da execução da prova da intradermotuberculização (IDT) como no caso dos animais jovens, ou na falta de equipamentos de contenção nas explorações em regime extensivo; (iii) as falhas no cumprimento rigoroso do protocolo realização da IDT, na interpretação do resultado da leitura e no incumprimento da frequência de rastreios; (iv) a existência de zonas de risco reconhecido por coabitação de bovinos com animais de caça maior (veados e javalis); e (v) a suspeita de irregularidades na identificação e/ou movimentação animal.

Abordagem Regional para a erradicação da tuberculose bovina

O Plano de Erradicação da Tuberculose é estabelecido de acordo com o Regulamento Delegado (UE) 2020/689 da Comissão, de 17 de dezembro de 2019. A acrescer às medidas gerais de rotina previstas no Plano como a imposição do sequestro, a elaboração de inquéritos epidemiológicos, com o objetivo de apurar a origem da infeção, e a realização e acompanhamento pelos serviços oficiais do abate sanitário célere dos animais positivos à prova IDT, a nível regional tem-se feito o reforço de atuação através da seguinte estratégia:

1. Fomento de reuniões periódicas/ promoção de contactos frequentes entre técnicos dos serviços oficiais e médicos veterinários das OPSA para avaliação da evolução sanitária da região, divulgação e análise de normas ou procedimentos enviados pelos serviços centrais, esclarecimentos e troca de informações, melhoria de procedimentos e planeamento de ações futuras adequadas. Está também prevista melhoria na articulação com a autoridade competente na área da saúde humana.
2. Reforço na formação contínua dos médicos veterinários dos serviços veterinários oficiais, incluindo inspetores sanitários, e das OPSA, através de ações teórico-práticas sobre a prova IDT, biossegurança, deteção de lesões em matadouro e investigação epidemiológica de focos.
3. Estreito acompanhamento documental e físico da evolução e da execução técnica dos Programas Sanitários Anuais, elaborados pelo Médico Veterinário Coordenador das OPSA com incremento dos controlos presenciais de ações de campo onde é realizada a prova IDT, com maior incidência nas áreas mais afetadas pela Tuberculose.
4. Monitorização específica de todos os casos detetados em matadouro, com análise da movimentação animal, registo e divulgação pelas entidades envolvidas das notificações e dos resultados laboratoriais, com acompanhamento das medidas epidemiológicas consequentes nos estabelecimentos abrangidos, e priorizando o controlo presencial das provas IDT, quando previstas.
5. Monitorização do cumprimento das reinspeções e atuação incisiva com vista à execução das mesmas dentro dos prazos previstos.

6. Aviso prévio enviado ao Corpo de inspeção sanitária do matadouro, sobre a chegada de bovinos provenientes de estabelecimento em acompanhamento sanitário por tuberculose.

7. Adoção de outras medidas, para além da rotina de testagem e abate sanitário dos positivos, decorrentes de análise epidemiológica conjunta com os médicos veterinários das OPSPA e produtores, visando envolver todos os intervenientes na decisão e criar confiança e credibilidade na atuação dos serviços oficiais:

- Realização da prova IDT simples em efetivos infetados;
- Recurso à prova de Gama interferão em efetivos infetados, em zonas de risco;
- Avaliação da capacidade de erradicação do foco e, sempre que não for favorável, recomendação de abates total;
- Promoção da identificação eletrónica dos bovinos, especialmente em estabelecimentos infetados;
- Notificação dos gestores dos baldios (pastagens comunais), sempre que um estabelecimento de um compartimento é colocado em sequestro e por isso impedido de movimentar animais ao baldio;
- Rastreio de caprinos que sejam coabitantes de bovinos em efetivos infetados.

8. Em alguns distritos do país, nomeadamente os já identificados em 2011 em Edital como possuindo concelhos de risco para a tuberculose bovina, a erradicação tem-se demonstrado difícil, uma vez que existe circulação de agentes patogénicos do complexo *Mycobacterium tuberculosis* em animais selvagens, nomeadamente *M. bovis*, que constituem um risco de permanente transmissão do agente aos animais domésticos. Os sistemas de produção em regime extensivo que existem nessas áreas da região raiana de parte da região do Centro e do Alentejo propiciam os contactos diretos e indiretos entre bovinos, veados e javalis, especialmente em épocas de carência de água e de alimentos, traduzindo-se num ponto crítico de grande relevo relativamente à ocorrência de novos focos e na manutenção da infeção. Resultante da ausência de montarias durante a pandemia de CoVID-19, observou-se um aumento considerável da população de javalis e veados que se vem traduzindo num aumento de tuberculose bovina.

Nestas zonas de risco, quando há montarias, tem-se dado cumprimento ao Edital nº 1/2011 da tuberculose em caça maior ou ao Plano de Vigilância de caça maior, reforçando-se as seguintes medidas:

- A proteção da saúde dos manipuladores das peças, dos troféus de caça e dos próprios caçadores;
- O exame inicial realizado por médico veterinário às peças de caça destinadas ao autoconsumo pelos caçadores, ou à colocação no mercado, depois de sujeitas a inspeção sanitária num estabelecimento aprovado, como forma de preservar a respetiva segurança sanitária;
- A recolha de amostras das lesões suspeitas e o seu encaminhamento para análise laboratorial no INIAV, IP - Laboratório Nacional de Referência;
- O encaminhamento e a eliminação dos subprodutos, pelas entidades gestoras, com o objetivo de prevenir a contaminação ambiental e assim contribuir para o controlo da tuberculose na fauna selvagem.

A eficácia desta atuação terá de passar pelo envolvimento dos produtores pecuários com o compromisso de criação de medidas de biossegurança dos seus estabelecimentos, incluindo a gestão de eventuais pontos de contacto da caça/fauna selvagem com os animais domésticos (barreiras físicas, alimentação e abeberamento), bem como pelo envolvimento dos gestores das zonas de caça na tomada de medidas para reduzir o contacto/risco de contágio, relevando o controlo das populações e a eliminação dos subprodutos.

Tratando-se de um problema complexo, o mesmo requer um plano estratégico com abordagem e colaboração intersectorial, envolvendo produtores pecuários e suas associações, associações e gestores de zonas de caça, proprietários rurais, médicos veterinários, universidades, laboratórios, o Instituto de Conservação da Natureza e Florestas (ICNF, IP) como autoridade competente na gestão das populações silvestres e a Direção Geral de Alimentação e Veterinária.

Aplicación del Programa Nacional de Erradicación de Tuberculosis en Comunidades Autónomas de Alta Prevalencia

Ángel Camacho Carrasco

Servicio de Sanidad Animal, Dirección General de la Producción Agrícola y Ganadera de la Consejería de Agricultura, Pesca, Agua y Desarrollo Rural. Junta de Andalucía.

angelj.camacho@juntadeandalucia.es

Introducción

El Programa Nacional de Erradicación de Tuberculosis Bovina se basa fundamentalmente en el diagnóstico periódico de bovinos con respecto a esta enfermedad y la retirada del rebaño de los animales sospechosos de estar infectados.

Anualmente España presenta a la UE para su aprobación y cofinanciación el documento de este programa adaptado a la evolución epidemiológica de la enfermedad en las distintas comunidades autónomas y que una vez aprobado se aplica en todo el territorio, y por tanto en Andalucía, que es una de las comunidades autónomas de alta prevalencia.

1. Medidas específicas para comunidades autónomas de alta prevalencia

1.1 Intensificación de la presión diagnóstica mediante intradermotuberculinización en función de la prevalencia comarcal

La **prueba diagnóstica** que se usa de manera rutinaria es la intradermotuberculinización simple (IDTBs), relegándose el uso de la intradermotuberculinización comparada (IDTBc) a situaciones muy excepcionales para las cuales se autoriza excepcionalmente su uso caso a caso, trabajándose así por regla general con niveles de sensibilidad más elevados.

En cuanto a la **frecuencia diagnóstica**, en los rebaños oficialmente calificados (T3) de comarcas con prevalencia de rebaño superior al 3% se duplica la presión diagnóstica y como regla general se efectúan dos pruebas anuales en los rebaños de aptitud reproductora. De este modo se busca en estas comarcas de más riesgo, paliar la sensibilidad “imperfecta” de la prueba y detectar una posible enfermedad residual en el rebaño o las nuevas infecciones cuanto antes, para poder extraer los animales del rebaño. En los rebaños positivos la frecuencia diagnóstica se sube a tres pruebas anuales, independientemente de la prevalencia comarcal.

Además de lo anteriormente expuesto, la **interpretación de la intradermotuberculinización** también se adecua a las circunstancias epidemiológicas. De este modo, en rebaños calificados como oficialmente indemnes se hace una interpretación severa de la técnica en comarcas con prevalencia de rebaño superior al 1%, y en caso de aparición de algún bovino positivo, todos los dudosos se consideran positivos directamente, sin someterse a la repetición de la prueba. Igualmente, en rebaños con el estatuto retirado, se hace una interpretación extra severa de la técnica de IDTB, considerándose positivo cualquier resultado dudoso. De este modo se persigue una vez más incrementar la sensibilidad de la prueba cutánea.

1.2 Uso del Gamma Interferón

En las comunidades autónomas de alta prevalencia en caso de rebaños confirmados etiológicamente se emplea en paralelo a la IDTB, la técnica del gamma interferón de forma simultánea. De esta manera igualmente se persigue alcanzar una mayor sensibilidad en conjunto y una más rápida retirada de los bovinos infectados. La consistencia además de las calificaciones oficialmente indemnes así obtenidas es superior, disminuyéndose las recidivas debidas a infecciones residuales en el rebaño provocadas por bovinos no reaccionantes en piel.

1.3. Controles administrativos de verificación de calificaciones oficialmente indemnes

En Andalucía, y en todas las comunidades autónomas de prevalencia mayor al 3%, se efectúa por parte de la administración una revisión de la calificación T3 de al menos un 2% de los rebaños calificados como T3. Esta comprobación se lleva a cabo mediante la repetición de las pruebas de mantenimiento del estatuto T3 por parte de los servicios veterinarios oficiales en un plazo no superior a sesenta días. De este modo se genera la posibilidad de detectar una posible falta de sensibilidad de la prueba de campo y se pueden adoptar así medidas correctoras.

1.4 Vacíos sanitarios

Otra diferencia que encontramos en comunidades autónomas de alta prevalencia es un empleo mucho más restringido de los vacíos sanitarios, que tiene menos sentido en situaciones de alta prevalencia y que cuenta además con mayor rechazo social. Esta herramienta sólo se usa tras valorar cada caso y dependiendo de la prevalencia comarcal, del historial de la explotación, de la presencia de posibles reservorios y del riesgo de reaparición de la enfermedad que se aprecie

2. Evolución de la Tuberculosis Bovina en Andalucía

La evolución de los indicadores epidemiológicos de tuberculosis en Andalucía, y en todo el territorio estatal en general, venía atravesando un estancamiento que originó la toma de medidas correctoras tras auditorías efectuadas sobre el terreno por parte de la Comisión Europea y del Ministerio. Estas medidas correctoras, entre las que se encontraban por ejemplo la formación de las personas veterinarias encargadas de efectuar la prueba cutánea, la aplicación de un plan de controles administrativos y otras, expuestas con anterioridad en el primer punto, permitió aflorar la situación real de la cabaña ganadera andaluza con respecto a la tuberculosis en los años 2015 y 2016, y desde ahí se consigue disminuir la prevalencia, incidencia de rebaño en incidencia individual hasta los niveles actuales (Fig. 1).

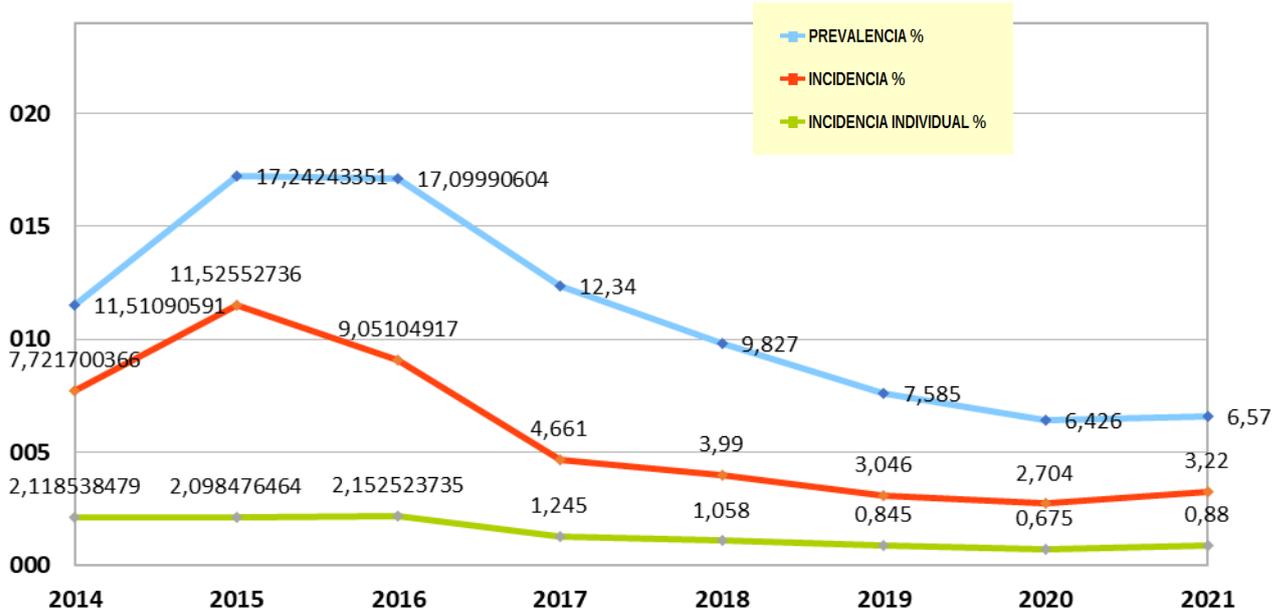


Fig. 1 Evolución de la prevalencia, incidencia de rebaño en incidencia individual en Andalucía (años 2014-2021)

En el momento actual parece haberse detenido la buena evolución con respecto a la tuberculosis, con lo cual se deberá analizar la situación y aplicar nuevas medidas que hagan avanzar hacia el objetivo.

No obstante lo anterior, los datos epidemiológicos anteriores siempre se deben poner en perspectiva, debiéndose resaltar el estado de la cabaña andaluza en su totalidad, que debe servir como acicate en aras de seguir persiguiendo el objetivo de la erradicación (Fig. 2)

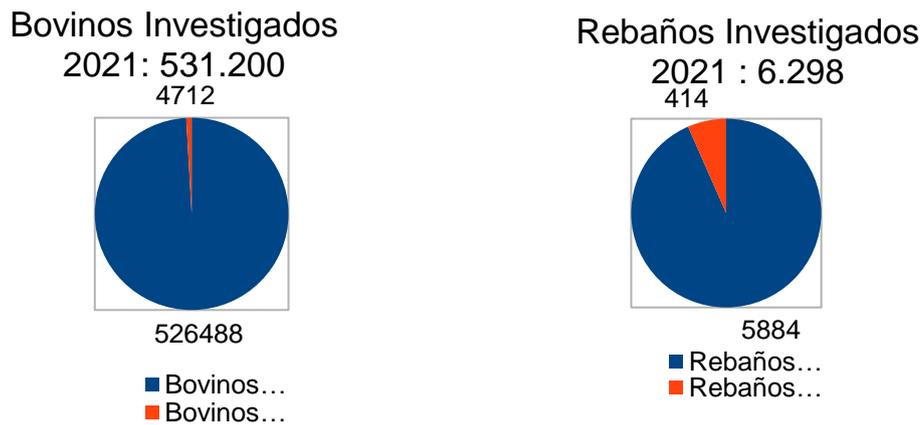


Fig. 2 Rebaños y bovinos investigados de tuberculosis en 2021

3. Principales obstáculos para la erradicación

Los principales obstáculos que se identifican en la actualidad, entre otros, son los que se exponen a continuación:

- Disponibilidad de unas pruebas diagnósticas complejas, que, si bien tienen suficiente sensibilidad y especificidad para ser usadas en un programa de erradicación, son pruebas basadas en la inmunidad celular y dependen del buen estado del sistema inmune de los animales. Igualmente son muy reseñables las interferencias diagnósticas por presencia de otras micobacterias en el rebaño. Además, la prueba de IDTB implica dos visitas a la explotación y lecturas en condiciones no siempre idóneas y la prueba del gamma interferón requiere un corto espacio de tiempo desde la toma de muestras hasta la estimulación de las mismas en el laboratorio, lo cual dificulta el diagnóstico
- La calificación positiva de un rebaño implica pérdidas económicas cuantiosas, fundamentalmente por la limitación de los movimientos y también por las pérdidas de producción láctea y cárnica.
- Se detecta también una falta de confianza en el programa y una cierta aceptación de la convivencia con la enfermedad.
- Existencia de múltiples hospedadores silvestres y domésticos que pueden mantener la infección, ligado a un sistema productivo predominantemente extensivo que permite el contacto con la fauna silvestre y a un aprovechamiento cinegético simultáneo muchas veces con el aprovechamiento ganadero y cuyos intereses a veces pueden menoscabar los del aprovechamiento ganadero

4. Medidas para avanzar hacia la erradicación

En nuestra comunidad autónoma se pretende incidir en varias vías que sirvan de vuelta de tuerca que haga avanzar el programa hacia la erradicación en los próximos años:

- El desarrollo del protocolo EURLAB del gamma interferón para su uso de manera rutinaria, una vez contemplado el mismo en el Reglamento Delegado (UE) 2020/689, abre la posibilidad de desplazar el diagnóstico del campo a los laboratorios oficiales en más ocasiones, lo cual redundará en unas pruebas más homogéneas y podría incidir en la confianza en el programa.
- Implementación del Real Decreto 183/2020, con la consiguiente categorización de los espacios cinegéticos y la puesta en marcha de las auditorías de bioseguridad en las explotaciones bovinas positivas de las comarcas de especial riesgo
- Identificación de explotaciones reincidentes en el tiempo y estudio de las mismas con la finalidad de aplicar estrategias específicas para la problemática que se detecte.

Bibliografía

- Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 9 de marzo de 2016, relativo a las enfermedades transmisibles de los animales y por el que se

modifican o derogan algunos actos en materia de sanidad animal («Legislación sobre sanidad animal») (Texto pertinente a efectos del EEE)

- Reglamento Delegado (UE) 2020/689 de la Comisión, de 17 de diciembre de 2019, por el que se completa el Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo referente a las normas de vigilancia, los programas de erradicación y el estatus de libre de enfermedad con respecto a determinadas enfermedades de la lista y enfermedades emergentes
- Ley 8/2003 de 24 de abril, de sanidad animal
- Real Decreto 2611/1996, de 20 de diciembre, por el que se regulan los programas nacionales de erradicación de enfermedades de los animales Real Decreto 186/2011, de 18 de febrero, por el que se regula la calificación sanitaria de las ganaderías y explotaciones de reses de lidia y el movimiento de los animales pertenecientes a las mismas.
- Real Decreto 389/2011, de 18 de marzo, por el que se establecen los baremos de indemnización por el sacrificio de animales en el marco de los programas nacionales de lucha, control o erradicación de la tuberculosis bovina, brucelosis bovina, brucelosis ovina y caprina, lengua azul y encefalopatías espongiiformes transmisibles.
- Real Decreto 50/2018, de 2 de febrero, por el que se desarrollan las normas de control de subproductos animales no destinados al consumo humano y de sanidad animal, en la práctica cinegética de caza mayor.
- Real Decreto Real Decreto 138/2020, de 28 de enero, por el que se establece la normativa básica en materia de actuaciones sanitarias en especies cinegéticas que actúan como reservorio de la tuberculosis (complejo *Mycobacterium tuberculosis*).
- Orden de 29 de noviembre de 2004, por la que se desarrollan las normas de ejecución de los programas nacionales de vigilancia, prevención, control y erradicación de las enfermedades de los animales en Andalucía (B.O.J.A. nº 241, de 13/12/2004).
- Decreto 65/2012, de 13 de marzo, por el que se regulan las condiciones de sanidad y zootécnicas de los animales.
- Orden de 2 de mayo de 2012, conjunta de las Consejerías de Agricultura y Pesca y Medio Ambiente, por la que se desarrollan las normas de control de subproductos animales no destinados al consumo humano y de sanidad animal, en la práctica cinegética de caza mayor de Andalucía.

Otra documentación oficial

- Programa Nacional de erradicación de tuberculosis bovina presentado por España para el año 2022 (Programa Nacional)
- Programa Nacional de erradicación de tuberculosis bovina en Andalucía 2022

MESA REDONDA II

Moderador: Dr. Christian Gortázar



Programa de vigilancia epidemiológica de la fauna silvestre en Andalucía. Tuberculosis.

Félix Gómez-Guillamón Manrique¹, Leonor N. Camacho Sillero¹, Ventura Talavera Navarrete¹

¹Programa de Vigilancia Epidemiológica de la Fauna Silvestre en Andalucía (PVE), Consejería de Sostenibilidad, Medio Ambiente y Economía Azul, Junta de Andalucía, Málaga, España.

felixj.gomezguillamon@juntadeandalucia.es

La tuberculosis, causada por micobacterias del Complejo *Mycobacterium tuberculosis*, es una enfermedad infecciosa extendida por todo el mundo con un alto rango de hospedadores entre los que se incluyen el hombre (1). Se transmite entre el ganado doméstico y las poblaciones de fauna silvestre tanto de forma directa como indirecta (2). Considerada endémica en las poblaciones de ungulados silvestres en la Península Ibérica, esta enfermedad causa grandes pérdidas económicas en la producción ganadera y la sanidad animal de nuestro país (1, 3). Si bien, estudios previos, han demostrado y concluido que tanto el jabalí (*Sus scrofa*) como el ciervo (*Cervus elaphus*) constituyen los reservorios más relevantes en la Península Ibérica, donde son capaces de mantener y transmitir de manera eficaz el agente causal de esta enfermedad incluso en ausencia de otros hospedadores tanto domésticos como silvestres (4).

El centro-sur de España es, probablemente, la región con la prevalencia de tuberculosis más elevada en fauna silvestre reportada en la literatura internacional. La mayoría de los estudios llevados a cabo han sido sobre territorios concretos, centrados en poblaciones específicas sin abarcar grandes extensiones de dicha parte del país. Dichos estudios, han puesto de manifiesto una prevalencia de tuberculosis en jabalí comprendida entre el 52% y el 70%, llegando en algunas zonas a estar alrededor del 100% (3-5).

El Programa de Vigilancia Epidemiológica de la Fauna Silvestre en Andalucía (PVE) se pone en marcha por la Dirección General del Medio Natural, Biodiversidad y Espacios Protegidos de la Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible en el año 2009, con el fin de determinar y preservar el estado sanitario de la fauna silvestre andaluza, y coordinar con las administraciones con competencias en sanidad animal y salud pública en Andalucía las medidas de intervención más adecuadas, ya sean de prevención, de lucha o de control, en base a lo establecido en la Ley 8/2003, de 28 de octubre, de la Flora y la Fauna silvestres y el Decreto 126/2017, de 25 de julio, por el que se aprueba el Reglamento de Ordenación de la Caza en Andalucía.

La importancia de la vigilancia epidemiológica de determinados agentes patógenos que afectan a la fauna silvestre reside en el papel que tienen muchas de estas especies como reservorio de determinadas enfermedades que afectan al ganado doméstico, por sus repercusiones en la salud pública como zoonosis que afectan al hombre y en la conservación y gestión de las especies de fauna silvestre como la tuberculosis tal y como se ha reconocido desde instituciones de ámbito internacional (la Organización Mundial de la Salud, la

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y la Organización Mundial de la Sanidad Animal, a través de las múltiples referencias al concepto «una sola salud» (*One Health*).

El PVE en Andalucía fue pionero, poniéndose en marcha con anterioridad al Plan Nacional de Vigilancia de Fauna Silvestre (PVFS). Sus comienzos en el año 2009 fueron realizando un control sanitario en las poblaciones de pequeños carnívoros, en las comarcas de Guadalmellato (Córdoba) y Guarrizas (Jaén), como una de las medidas para garantizar el éxito de las primeras reintroducciones de lince ibérico (*Lynx pardinus*) en Andalucía. Posteriormente, se pasaron a aplicar los protocolos de vigilancia específicos para especies cinegéticas y para especies protegidas (rapaces, aves marinas, acuáticas, esteparias, tortugas terrestres y marinas y mamíferos marinos).

El PVE cuenta con dos protocolos de actuación en función del tipo de vigilancia realizada:

- **Programa vigilancia activa** con protocolos por especies muestreadas de forma aleatoria en la actividad cinegética. en 9 especies (conejo silvestre, liebre ibérica, perdiz roja, jabalí, ciervo, corzo, gamo, cabra montés y muflón). Por veterinarios del PVE se lleva a cabo la toma de muestras en más de 250 cotos de caza colaboradores, Reservas Andaluza de Caza y los Espacios Naturales de Doñana, Sierra Nevada y Sierra de las Nieves, también se realizan encuestas epidemiológicas con el fin de analizar las enfermedades objeto de estudio en cada especie, las prevalencias de cada una de estas enfermedades y los factores de riesgo asociados a la presentación de las mismas. Los informes, fruto de estos muestreos, se difunden en el Portal de Caza y Pesca de la web de la Consejería de Sostenibilidad Medio Ambiente y Economía Azul con análisis e interpretación de los resultados, conclusiones y recomendaciones para disminuir la transmisión de los agentes patógenos estudiados. **Hasta la fecha, el PVE ha muestreado en cuatro fases ya finalizadas y en la quinta fase, actualmente en ejecución, más de 12.000 ejemplares con una cifra aproximada de 100.000 analíticas realizadas.**

- Por otro lado, el **PVE puso en marcha en el año 2010 un Programa de vigilancia pasiva**, mediante la Red de Alerta Sanitaria de la Fauna Silvestre (RASFAS), con la activación del Protocolo de Emergencias Sanitarias del PVE en caso de que se produzca una incidencia en especies silvestres por mortandad anormal o en brotes significativos de una enfermedad en estas especies con el objetivo de investigar y determinar su causa. **A fecha octubre de 2022 se han atendido más de 130 episodios de Emergencias Sanitarias**, destacando la detección por primera vez en Europa, del virus de Bagaza en el año 2010 en perdices y faisanes en la Campiña de Cádiz, la detección en 2013 de la nueva variante de la Enfermedad Hemorrágica Vírica, afectando de forma grave a las poblaciones de conejo silvestre, así como en 2018 el salto entre especies del virus de la mixomatosis a la liebre ibérica, que ha diezmando de forma significativa sus poblaciones en toda la Península Ibérica.

Con **aproximadamente 3000 ejemplares de jabalí y alrededor de 2500 cérvidos muestreados**, los **resultados obtenidos** respecto a la **tuberculosis** en los diferentes estados de ejecución del PVE ponen de manifiesto el papel, tanto de los cérvidos como del jabalí, como reservorio de esta enfermedad. La distribución espacial de los resultados es heterogénea, con una variación según la zona de muestreo que coincide con aquellas donde la prevalencia de tuberculosis es, igualmente, elevada en ganado doméstico. En la siguiente tabla puede apreciarse los resultados obtenidos en cada estado de ejecución del PVE y la evolución en el tiempo de estos mismos resultados obtenidos desde el 2009 hasta mayo de 2022.

TUBERCULOSIS	Prevalencia JABALÍ	Prevalencia CÉRVIDOS
PVE I (2009/12)	2,3% (9/392). (PCR)	2,90% (6/209). (PCR)
PVE II (2012/15)	19,26% (116/618). (ELISA)	6,90% (43/623). (ELISA)
PVE III (2015/18)	21,00% (152/724). (ELISA)	11,94% (77/645). (ELISA)
PVE IV (2018/21)	17,52% (154/879). (ELISA)	7,84% (46/587). (ELISA)
PVE V (2021/24) (provisional aprox. 50%)	21,53% (76/353). (ELISA)	5,64% (19/337). (ELISA)

Posteriormente, se procede al cultivo del linfonodo mandibular, en caso del jabalí, así como del linfonodo retrofaríngeo, en el caso de cérvidos, de los ejemplares positivos a serología y de los ejemplares que, aunque negativos a esta técnica, presentan lesiones compatibles con tuberculosis. Los resultados de espoligotipado obtenidos de los cultivos de dichas muestras han sido los mostrados en la siguiente tabla:

Resultados Espoligotipos	Jabalí (n)	Resultados Espoligotipos	Cérvidos (n)
SB0121. PC con <i>M. bovis</i>	11	SB0121. PC con <i>M. bovis</i>	1
SB0134. PC con <i>M. bovis</i>	1	SB1230. PC con <i>M. bovis</i>	1
SB0157. PC con <i>M. caprae</i>	6	SB0339. PC con <i>M. bovis</i>	1
SB0295. PC con <i>M. bovis</i>	2	SB1174. PC con <i>M. bovis</i>	1
SB0950. PC con <i>M. bovis</i>	3	SB1190. PC con <i>M. bovis</i>	2
SB1081. PC con <i>M. caprae</i>	6		
SB1230. PC con <i>M. bovis</i>	4		
SB1232. PC con <i>M. bovis</i>	2		
SB1265. PC con <i>M. bovis</i>	1		
SB1572. PC con <i>M. bovis</i>	1		
SB1627. PC con <i>M. bovis</i>	1		
SB2337. PC con <i>M. bovis</i>	1		

PC: Perfil compatible.

La labor de este Programa es indispensable para el seguimiento y el mantenimiento de un buen estado sanitario de las poblaciones de especies silvestres del medio natural en Andalucía. Y con ello poder determinar las enfermedades que pueden afectar a la conservación de estas especies, a la sanidad del ganado doméstico y las que tengan repercusiones en la salud pública afectando al hombre. La consecución de los objetivos del PVE es posible gracias a la colaboración del sector cinegético y el personal adscrito a las Reservas Andaluzas de Caza y a los Espacios Naturales Protegidos existentes en Andalucía.

Bibliografía:

1. García-Bocanegra, I., Pérez de Val, B., Arenas-Montes, A., Paniagua, J., Boadella, M., Gortázar, C., Arenas, A., 2012. Seroprevalence and risk factors to *Mycobacterium bovis* in wild artiodactyl species from southern Spain, 2006-2010. PloS ONE 7(4): e34908. Doi: 10.1371/journal.pone.0034908.
2. Hermoso de Mendoza, J., Parra, A. Tato, A., Alonso, J.M., Rey J.M., Peña, J., García-Sánchez, A., Larrasa, J., Teixidó, J., Manzano, G., Cerrato, R., Pereira, G., Fernández-Llario, P.,

- Hermoso de Mendoza, M., 2006. Bovine tuberculosis in wild boar (*Sus scrofa*), red deer (*Cervus elaphus*) and cattle (*Bos taurus*) in a Mediterranean ecosystem (1992-2004). Preventive Veterinary Medicine, 2006. May 17;74(2-3): 239-47. doi: 10.1016/j.prevetmed.2005.10.005. Epub 2005 Nov 16.
3. Vicente, J., Hofle, U., Garrido, J.M., Fernández-De-Mera, I.G., Juste, R., Baral, M., Gortazar, C., 2006. Wild boar and red deer display high prevalences of tuberculosis-like lesions in Spain. Veterinary Research, 37, 107-119. doi: 10.1051/vetres:2005044.
 4. Barasona, J.A., Torres, M.J., Aznar, J., Gortázar, C., Vicente, J., 2017. DNA Detection Reveals *Mycobacterium tuberculosis* complex shedding routes in its wildlife reservoirs the eurasian wild boar. Transboundary and Emerging Diseases, 64(3): 906-915. doi:10.1111/tbed.12458.
 5. Vicente, J., Barasona, J.A., Acevedo, P., Ruiz-Fons, F., Boadella, M., Díez-Delgado, I., Beltrán-Beck, B., González-Barrio, D., Queirós, J., Montoro, V., de la Fuente, J., Gortázar, C., 2013. Temporal trend of tuberculosis in wild ungulates from Mediterranean Spain. Transboundary and Emerging Diseases, 60(1). 92-103. doi: 10.1111/tbed.12167.

Web

Portal de la Caza y la Pesca Continental de Andalucía (2022). Disponible en: https://www.cma.junta-andalucia.es/medioambiente/portal/web/caza-y-pesca/indice/-/asset_publisher/IP4Z3AqUBBz1/content/programa-de-vigilancia-epidemiol-c3-b3gica-de-la-fauna-silvestre-en-andaluc-c3-ada-pve--1/20151

Legislación

Ley 8/2003, de 28 de octubre, de la Flora y la Fauna Silvestres. Boletín Oficial del Estado, de 2 de diciembre de 2003, núm. 288 y Boletín Oficial de la Junta de Andalucía, de 12 de noviembre de 2003, núm. 218. Referencia: BOE-A-2003-21941. Disponible en: <https://www.boe.es/eli/es-an/l/2003/10/28/8/con>

Decreto 126/2017, de 25 de julio, por el que se aprueba el Reglamento de Ordenación de la Caza de Andalucía. Boletín Oficial de la Junta de Andalucía. Núm. 149. Disponible en: <http://juntadeandalucia.es/boja/2017/149/5>.

Gestión cinegética responsable para el control de la TB en cotos de caza

José Antonio López García

Coordinador de Asuntos Técnicos de la Federación Andaluza de Caza (FAC).

joseantonio@fac.es

La Federación Andaluza de Caza, como asociación deportiva, en la actualidad integra a más de 90.000 cazadores andaluces. Presta asesoramiento técnico y jurídico a más de 1.400 clubes deportivos en materia de caza, que gestionan en torno a 2.800 cotos deportivos, que suman un total de tres millones de hectáreas en toda Andalucía.

Es necesario indicar que los cotos deportivos de caza adscritos a la FAC conforman terrenos cinegéticos en los que la prioridad es la ejecución de una actividad con un importante componente social y arraigo cultural de nuestros pueblos. Aunque en estos acotados, según su categoría y localización geográfica, se pueda practicar tanto la caza mayor como la caza menor, la segunda adquiere una mayor relevancia para nuestras sociedades deportivas. Este hecho hace que no seamos productores de caza mayor en sentido estricto y que nuestra actividad cinegética basada en el aprovechamiento de las especies cinegéticas mayores (jabalí, ciervo, gamo, cabra montés, muflón y corzo), las cuales conforman hospedadores del complejo bacteriano causante de la enfermedad, se ejecute fundamentalmente en cotos abiertos. Estos acotados están conformados por hábitats forestales, la mayoría de los cuales se localizan sobre montes públicos, tutelados por la administración competente en materia ambiental, a los cuales accedemos mediante la participación en procesos y expedientes de licitación pública del aprovechamiento cinegético de dichos terrenos.

En cualquier caso, y en relación con el control de la tuberculosis animal, como enfermedad infeccioso-contagiosa producida por el complejo *Mycobacterium tuberculosis*, nuestra organización es consciente, y muestra su preocupación, por el importante efecto negativo que esta patología puede causar en otros tipos de aprovechamientos presentes en el medio rural, que sirve de soporte vital para nuestra actividad.

La FAC, como institución con fuerte arraigo en nuestro entorno rural no puede mantenerse al margen de la problemática que suscita la presencia de la tuberculosis en la actividad ganadera, por el impacto económico que genera en las explotaciones, pero también en la actividad cinegética, habida cuenta que la presencia de esta enfermedad en los ungulados objeto de aprovechamiento cinegético, sobre todo ciervo y jabalí, puede originar disminución de poblaciones por mortalidad, con la consiguiente disminución en la cantidad y la calidad de los trofeos o una menor producción de carne, y todo ello redundando, como en el tema ganadero, en pérdidas económicas para todos los sectores.

No podemos olvidar que la TB también es una enfermedad zoonótica, y que por tanto puede ser transmitida a los seres humanos. Por último, también es necesario señalar,

dado que la FAC ha participado como socio en varios Proyectos Life de conservación, que la tuberculosis también supone un riesgo para especies protegidas tan emblemáticas como el lince ibérico, carnívoro sensible a la infección.

Por todo lo anterior, entre las actuaciones que deben implementarse para el control de esta enfermedad, todos los agentes que tengan intereses o desarrollen actividades en el medio rural, deben unirse y desarrollar alianzas y estrategias conjuntas para luchar contra esta enfermedad. En relación con esta última cuestión, que creemos crucial, ¿qué puede hacer el colectivo de cazadores representado por la Federación Andaluza de caza?

En primer lugar, seguir colaborando activamente con el Plan de Vigilancia Epidemiológico de Andalucía, que lleva a cabo la Consejería de Sostenibilidad, Medio Ambiente y Economía Azul de la Junta de Andalucía, poniendo a disposición de los servicios técnicos veterinarios de la administración la recogida de muestras de las reses abatidas para la detección y seguimiento de la enfermedad. Por su puesto facilitar el trabajo a los técnicos veterinarios que nos asisten en la celebración de jornadas colectivas de caza a través de monterías, ganchos y batidas en los cotos de caza que gestionamos.

Seguir ejecutando sobre nuestras especies de ungulados cinegéticos una gestión coherente y responsable de sus poblaciones, a través de las herramientas que nos proporcionan la redacción de los Planes Técnicos de Caza para los cotos, que son supervisados y aprobados por la administración competente en materia cinegética de Andalucía.

Con independencia de la celebración de las modalidades de caza colectivas citadas con anterioridad, a nivel de redacción de los Planes Técnicos de Caza, la caza de gestión (caza selectiva y de control de poblaciones a través de recechos y aguardos) conforma una herramienta de gestión y control muy adecuada y eficaz para las poblaciones cinegéticas objeto de aprovechamiento.

La FAC debe seguir colaborando con la administración andaluza en la implementación y desarrollo, cuando sea necesario y así sea aconsejable técnicamente, de normas que permitan el control poblacional de los ungulados que conforman reservorios de la enfermedad. Sirvan de ejemplo las resoluciones conjuntas de la Dirección General de la Producción Agrícola y Ganadera y la Dirección General de Medio Natural, Biodiversidad y Espacios Protegidos, por la que se declara el área de emergencia cinegética temporal por daños y riesgos sanitarios de jabalí y cerdo asilvestrado, en la Comunidad Autónoma de Andalucía, o las distintas resoluciones por la que se declaran las Áreas de Emergencia Cinegética temporal por sarna sarcóptica en cabra montés, en varios términos municipales de las provincias de Almería, Cádiz, Granada, Jaén, Málaga y Sevilla.

En otro orden de cuestiones el PATUBES (Real Decreto 138/2020, de 28 de enero. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación) señala e identifica la correcta gestión que ha de realizarse sobre los subproductos animales no destinados a consumo humano (SANDACH) procedentes de la actividad cinegética mayor, que en Andalucía se implementa mediante el decreto 68/2009, de 24 de marzo, por el que se regulan las disposiciones específicas para la aplicación de la normativa comunitaria y estatal en materia de subproductos de origen animal no destinados a consumo humano en la comunidad autónoma de Andalucía. El abandono de estos residuos en el medio generaría continuidad al ciclo de transmisión de enfermedades en la fauna silvestre (tuberculosis o triquinosis).

Por último, también hay que señalar que realizar una adecuada gestión del hábitat también contribuiría, cuando menos, a frenar un posible desarrollo de la TB. Estas medidas deben ir dirigidas a evitar el hacinamiento y la agregación de los animales en puntos

concretos, sobre todo si en los terrenos existe además del aprovechamiento cinegético, un aprovechamiento ganadero. Por tanto, una correcta gestión del suplemento de alimento y/o presencia de puntos de agua, en caso de necesidad sobre todo en los periodos más críticos del año, que coinciden con la época estival, contribuirán a minimizar los riesgos de transmisión y contagio. En cuanto a los puntos de agua, son preferibles los cauces fluviales naturales, embalses y las charcas de mayor diámetro y profundidad.

En todo caso, para la ejecución de todas estas medidas, en el marco de una gestión cinegética responsable, se requiere el compromiso y la participación de todo el sector con vinculación en mataría de caza, incluyendo a la administración, las sociedades de cazadores, los técnicos y gestores cinegéticos, las federaciones autonómicas de caza y por su puesto los cazadores.

Bibliografía:

Guía de buenas prácticas para el control integral de la tuberculosis animal en explotaciones ganaderas extensivas y cotos de caza. Benítez Medina, J.M. et al. FEADER. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación del Gobierno de España. Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural, Población y Territorio de la Junta de Extremadura. 2021.

Guía de Aplicación para el sector cinegético del Real Decreto 138/2020, por el que se establece la normativa básica en materia de actuaciones sanitarias en especies cinegéticas que actúan como reservorio de la tuberculosis. Urbani N., Villanueva L.F., Real Federación España de Caza. Fundación Artemisan. Aproca España. 2020.

Control de la tuberculosis en la interfaz

Joaquín Antonio Pino

ASAJA - Asociación Agraria Jóvenes Agricultores, Ávila, Castilla y León, España.

presidente@asajaaavila.com

Joaquín Antonio Pino. Ávila, 10 de noviembre de 1981.

Licenciado en Veterinaria por la Universidad de León (2004), en las especialidades de Medicina y Sanidad Animal; Producción Animal y Economía; y Bromatología, Sanidad y Tecnología de los Alimentos.

Ingeniero Agrónomo por la Universidad Católica Santa Teresa de Jesús de Ávila (2021).

1) En la lucha contra las enfermedades animales, y especialmente para avanzar en la erradicación de la tuberculosis bovina, es imprescindible tener claro el binomio ganadero-veterinario. Ir de la mano y contar con la implicación del sector ganadero y sus representantes, las organizaciones profesionales agrarias, así como los cazadores, es especialmente importante en aquellas zonas donde la fauna juega un papel importante en el mantenimiento y transmisión de la enfermedad.

2) Se debe poner en valor el trabajo del veterinario que participa en los programas de erradicación de la tuberculosis animal y propiciar su desarrollo profesional. El colectivo veterinario debe ganar mayor credibilidad en esta lucha contra la enfermedad, mejorando su formación continua y avances científicos en lo referente a la tuberculosis, participando de la mano de las organizaciones profesionales agrarias y agrupaciones de defensa sanitaria ganadera en jornadas de divulgación y transferencia del conocimiento científico al sector ganadero, mejorando el asesoramiento en campo a la hora de implementar medidas de bioseguridad y cambios de manejo a los ganaderos con problemas en la lucha contra la tuberculosis y promoviendo líneas de ayuda oficiales para estas cuestiones dentro de las intervenciones autonómicas de desarrollo rural del PEPAC.

3) Una ejecución homogénea del Programa Nacional de Erradicación de Tuberculosis Bovina en todo el territorio español ante circunstancias epidemiológicas similares o idénticas.

4) Mejorar la vigilancia pasiva y coordinación con los servicios veterinarios de salud pública de los mataderos.

5) Una implicación real de los departamentos con competencias de caza y medio ambiente, tanto a nivel de la administración general del Estado como de las diferentes comunidades autónomas, en el programa de erradicación de la tuberculosis animal.

Hoy día se cuenta con las herramientas normativas necesarias para poder controlar la fauna silvestre, singularmente del jabalí, actuante como reservorio y transmisor de la enfermedad en algunos territorios, como el Real Decreto 138/2020 que cataloga la incidencia de la

enfermedad en la fauna silvestre o la figura de “emergencia cinegética” recogida en las leyes autonómicas de caza para casos de daños por sobreabundancia y riesgos para la salud. Es necesaria una voluntad política clara e implicación de la parte competente en medio ambiente asumiendo responsabilidades para avanzar en ciertas zonas y territorios en lucha contra la tuberculosis animal y lograr su erradicación en el conjunto del Estado.

6) Necesidad de llevar *a pie de campo* el concepto “One Health” (una sola salud) donde todas las partes implicadas con competencias en sanidad animal, salud pública y medio ambiente trabajen y asuman responsabilidades conjuntamente y e igualdad para avanzar en la lucha y erradicación de la tuberculosis animal.

CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

Las aportaciones al II Workshop Ibérico en Investigación en Tuberculosis Animal celebrado el 17 y 18 de noviembre de 2022 en Córdoba se han presentado en forma de ponencias científicas, comunicaciones de los grupos de investigación que trabajan en tuberculosis animal y mesas redondas. A partir de todas ellas pueden extraerse las siguientes conclusiones generales:

1. Las micobacterias tuberculosas, en nuestro contexto europeo, se consideran entre el 20% de patógenos más relevantes, particularmente cuando se evalúan junto a otros patógenos zoonóticos o animales. Así, la tuberculosis es un perfecto ejemplo de enfoque *One Health*, del cual se puede beneficiar el próximo sistema europeo coordinado de vigilancia de zoonosis. Se requiere para ello que diferentes sectores (salud animal, humana y ambiental) consideren conjuntamente sistemas de múltiples patógenos, huéspedes y medio ambiente mediante una aproximación transversal.

2. El complejo reto del control de la tuberculosis animal, una enfermedad multi-hospedador que puede transmitirse por diferentes vías directas e indirectas, requiere:

- Considerar a todas las especies animales implicadas: ganado y fauna silvestre.
- Involucrar a todos los actores relacionados: sector ganadero, servicios veterinarios, administraciones, investigadores, docentes, gestores cinéticos y empresas.
- Utilizar todas las herramientas de control eficaces a nuestro alcance.

3. La Ley de Sanidad animal ofrece nuevas posibilidades en cuestiones como la vigilancia de la tuberculosis animal, la contención de la enfermedad en el establecimiento infectado y la prevención de la infección o la reinfección de los rebaños, lo que incluye a aquellas especies silvestres que pueden actuar como reservorio de la enfermedad. En este sentido, se han realizado importantes avances en “buenas prácticas” en materia de bioseguridad en explotaciones extensivas, gracias al excelente trabajo realizado por los grupos de investigación de España y Portugal.

4. Se han realizado importantes avances en el diagnóstico de la tuberculosis animal *post mortem*, como el desarrollo de un protocolo validado para el uso de la PCR directa en tejidos como alternativa al cultivo microbiológico, gracias al excelente trabajo de la red de

laboratorios de referencia. Así mismo, recientemente también se han desarrollado nuevas metodologías altamente eficiente para la identificación y cuantificación de células infectadas con *Mycobacterium bovis* a partir de muestras ambientales.

5. Los datos genéticos y genómicos pueden facilitar la comprensión de la epidemiología y el control de la tuberculosis, como en la reconstrucción de las cadenas de transmisión con alta resolución espacio-temporal y en la identificación de casos fraudulentos. Así mismo, también se ha demostrado que las inferencias filodinámicas y filogeográficas basadas en estructuras Bayesianas pueden contribuir en gran medida a evaluar la contribución de los diferentes hospedadores al mantenimiento de la tuberculosis en un área.

6. El diagnóstico *ante mortem* de la tuberculosis animal continúa siendo un gran desafío, siendo necesario desarrollar técnicas más sensibles y específicas, o con una mejor relación coste-beneficio. La aplicación de técnicas de detección de gamma interferón como prueba “de rutina” necesita de investigación adicional. En este sentido, la evaluación a gran escala de nuevos antígenos diagnósticos en diferentes contextos epidemiológicos ibéricos, y su combinación con una plataforma de detección de multicitoquinas, podría maximizar la sensibilidad y la especificidad en el diagnóstico de esta enfermedad.

7. Existe una necesidad de rediseñar las estrategias de comunicación a los ganaderos y empoderarlos para mejorar la aceptabilidad y la búsqueda de soluciones a los retos del Programa de erradicación de tuberculosis bovina, así como incluir otras temáticas en la comunicación que preocupen al sector.

8. Debe incrementarse la motivación de los veterinarios de campo, mejorando la información que reciben por parte de la administración. Es imprescindible este apoyo para limitar los riesgos laborales y poner en valor su trabajo, no sólo en la realización de las pruebas de campo, sino también como parte fundamental en el aporte de soluciones personalizadas para el control y la prevención de la tuberculosis animal.

9. Entre Portugal y España son numerosas las similitudes en la estrategia y en la problemática en los Programas de control y erradicación de la tuberculosis bovina, por lo que sería interesante explorar en el futuro las posibilidades de incluir en ambos programas actuaciones conjuntas.

LISTADO DE ASISTENTES



GRUPOS CIENTÍFICOS

Grupo de Investigación en Sanidad Animal (GISAZ) de la Universidad de Córdoba (UCO)

M^a Ángeles Risalde Moya
Remigio Martínez Pérez
Ignacio García Bocanegra
David Cano Terriza
Javier Caballero Gómez
Saúl Jiménez Ruiz
Jesús Barbero Moyano
Adrián Beato Benítez
Débora Jiménez Martín
Sabrina Castro Scholten
Moisés González Juan
Jorge Paniagua Risueño
Borja José Nadales Martin
Salvador Rejón Segura
Leonor Muñoz Fernández
Tomás Fajardo Alonso

Grupo de Patología e Inmunología de la Universidad de Córdoba (UCO-PIG)

Jaime Gómez Laguna
Inés Ruedas Torres
Irene Magdalena Rodríguez-Gómez
Carmen Álvarez Delgado
Karola Fristiková
Fernanda Isabel Larenas Muñoz
Francisco José Pallarés Martínez

Patología Infecciosa Veterinaria (PATIN) de la Universidad de Extremadura (UEx)

José Manuel Benítez Medina
Javier Hermoso De Mendoza Salcedo
David Risco Pérez
Natalia Jiménez Pizarro
Laura Zalama Rosa
Helio Correia

Grup de Recerca en Malalties Transmissibles en Sanitat Animal (TRANSMISAN) de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAM)

Alberto Allepuz
Giovanna Ciaravino
Natalia Ciria Artiga

Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA), Institut de Recerca y tecnología Agroalimentàries (IRTA)

Enric Vidal Barba
Bernat Perez De Val
Zoraida Cervera Muñoz
Cristian David Melgarejo

Instituto Politécnico de Portalegre

Lina Costa

Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (Neiker)

Joseba Garrido Urkullu
Ramón A. Juste Jordán

Grupo de Investigación en Sanidad y Biotecnología (SaBio) del Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (IREC)

Julio Isla Rodríguez De Tembleque
María Cañete Aranda
Christian Gortázar Schmidt
Joaquín Vicente Baños

Unidad de Inmunología Microbiana. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)

Inmaculada Moreno Iruela
Mercedes Domínguez Rodríguez
Diego Gómez Coronado

Grupo de Investigación del Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) de la Universidad Complutense de Madrid (UCM)

Beatriz Romero Martínez
Alberto Gómez Buendía
Pilar Pozo Piñol
Víctor Lorente Leal
Javier Bezos Garrido
Amado Kent Ruiz Gil
Francisco Javier Lozano Barrilero
Lucía De Juan Ferré
Alberto A. Díez Guerrier
Javier Ortega Martín
Antonio Rodríguez Bertos

Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de León (ULE)

Ana Balseiro Morales
Gloria Herrero García

Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos da Universidade do Porto (CIBIO)

Nuno Santos

Centro de Investigação em Ciência Animal e Veterinária (CECAV) da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD)

Madalena Vieira-Pinto
Ana Carolina Abrantes

Grupo de Investigación de Histología y Patología Animal (HAP), Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria (IUSA-ULPGC)

Marisa Ana Andrada Borzollino

Landscape Epidemiology and Wildlife Diseases, Centre for Ecology, Evolution and Environmental Changes (cE3c). Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Mónica Vieira Cunha
Daniela Pinto
André Pereira

ADMINISTRACIÓN

Principado de Asturias

Javier Amado Fernández
Julio César Menéndez Fructuoso

Xunta de Galicia

Marta Muñoz Mendoza
Jesús Javier Orejas Fernández
Jorge Enrique Mourelo Estella

Junta de Extremadura

José Carlos Moreno Muñoz
Cristina Sanz Jiménez

Junta de Andalucía

Carlos Lara Márquez
Ángel Camacho Carrasco
Manuel Fernández Morente
Félix Gómez- Guillamón Manrique
Ventura Talavera Navarrete
Leonor N. Camacho Sillero

Junta de Castilla y León

Ana Grau Vila
Pablo Celso Cisneros Otero

Generalitat de Catalunya

Núria E. Ribas Lligoña
Carles Riera Martí

Generalitat Valenciana

Fernando Mínguez Milio
Manuel Lázaro Armengol

Comunidad de Madrid

Gema Benito Acero
Enrique Pagés Tardío

Gobierno de Aragón

Carmen Elduque Palomo

Gobierno de Cantabria

Ismael Esparza Escayola
María Sol Solares González

Gobierno de La Rioja

Margarita León Martínez
María Pascual San Martín

Gobierno de Canarias

Elena Chávez Hernández
Pedro Peláez Puerto

Gobierno de Navarra

David Navarro Caspistegui
César Fernández Salinas

Gobierno de Baleares

María Dulce Ferrer Camps
José Francisco Rigo Caldito

Gobierno de Murcia

Paulina Cámara García
Antonio José Vidal Gómez

Laboratorio Central de Sanidad Animal de Santa Fe

Lorena Arrogante Peñuela
María Jesús Ortega Sánchez

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación

José Luis Sáez Llorente
Beatriz Muñoz Hurtado
Juan Carlos Blázquez Sánchez
Esther Prieto Caballero
Margarita Díez Gallego

Direção Geral de Alimentação e Veterinária

Yolanda Vaz
Sílvia Maria Macedo Marques
Ana Sofia Campos
Ana Margarida Caria Fernandes Ferreira Nunes
María José Guerra Da Silva Branco Calixto
Cristina Sousa
Susana Isabel Fonseca

União dos ADS do Alentejo e Organização de Produtores Pecuários para a defesa sanitária dos Ruminantes de Serpa

Ana Luisa Pereira
Ana María Nunes Mexia Costa Falcão Coelho De Paina

DSAVRA - DAVAA - NAVELVAS

Maria José Estrela Godinho Correia Vallejo De Carvalho

Colegio Oficial de Veterinarios de Córdoba

Miguel Ángel Perea

EMPRESAS

ID-Vet, S.L

Ignacio García-Pastor Menchen
Loic Comtet
Laura Olagnon
Adrien Limozin

IDEXX

Juan Ignacio Salido Rodríguez
Jean-Luc Troch

Alternativa Tic S.L.

Juan Manuel López García

Grupo Zendal (CZ vaccines)

José Ramón De Jesús López

INGENASA

Ricardo García Arroyo

Ángel Venteo Moreno

Bio-X Diagnostics

Juan Carlos Cabrera

Representante de los Ganaderos

Joaquín Antonio Pino

Representante de las Federaciones de Caza

José Antonio López

ORGANIZAN:



PATROCINAN:



COLABORAN:

