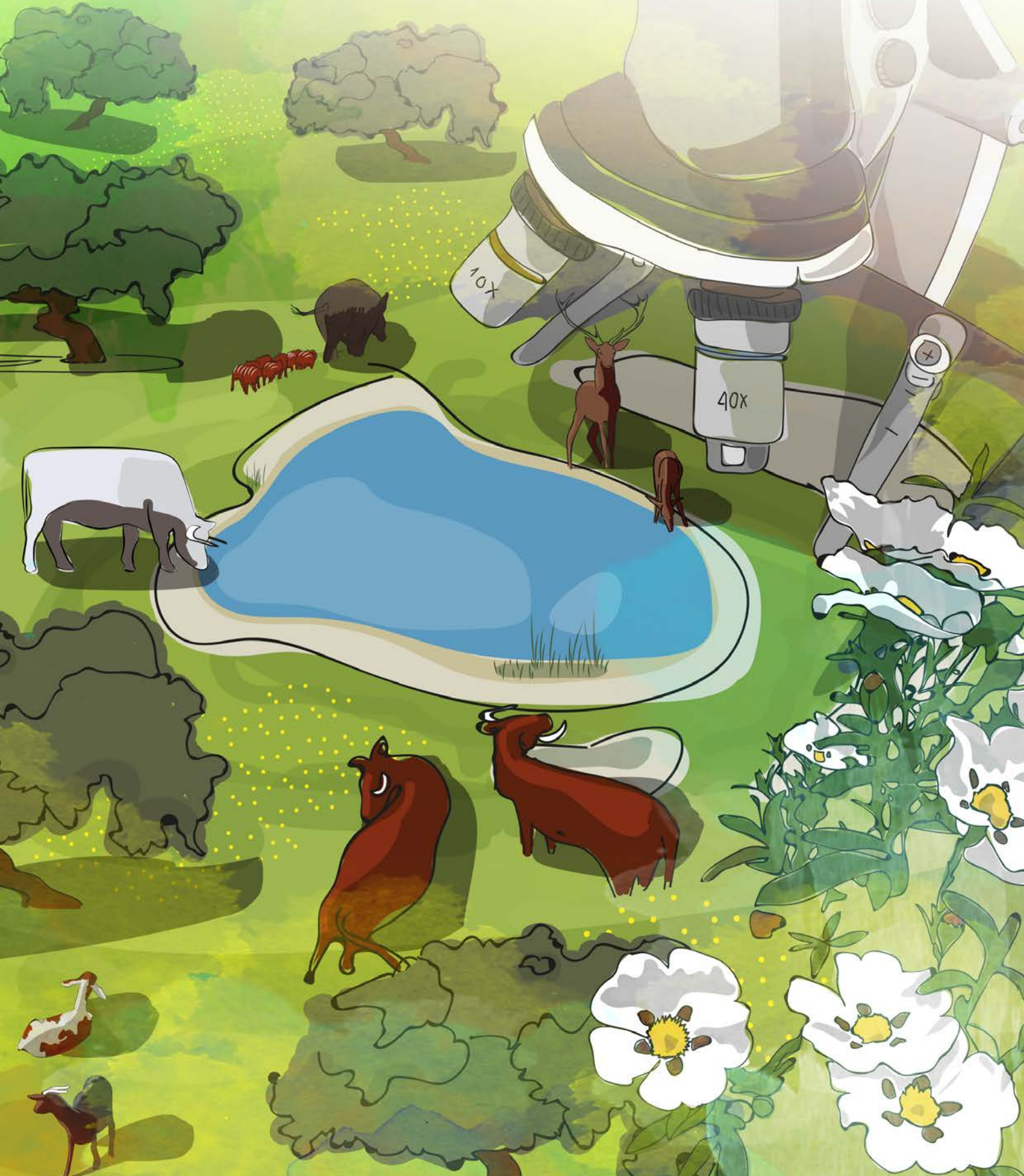
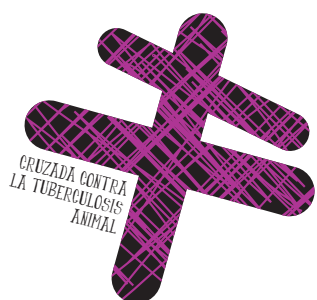




I WORKSHOP IBÉRICO Y II NACIONAL EN TUBERCULOSIS ANIMAL EN LÍNEA





I WORKSHOP IBÉRICO Y II NACIONAL EN TUBERCULOSIS ANIMAL EN LÍNEA



MINISTERIO DE AGRICULTURA, PESCA Y ALIMENTACIÓN

Edita:

©Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
Secretaría General Técnica
Centro de Publicaciones

Comité Organizador del Workshop:

José Luis Sáez Llorente

Área de Programas Sanitarios y Zoonosis, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación

Yolanda Vaz

Servicio de Protección Animal, Direcção Geral de Alimentação e Veterinária, Portugal

Cristina Sanz Jiménez

Dirección General de Agricultura y Ganadería, Consejería de Medio Ambiente y Rural, Políticas Agrarias y Territorio, Junta de Extremadura

Javier Hermoso de Mendoza Salcedo

Unidad de Patología Infecciosa, Departamento de Sanidad Animal, Universidad de Extremadura

María Luisa Tello Sánchez

TRAGSATEC S.A.,S.M.E.,M.P

María Teresa Hernández Guerra

TRAGSATEC S.A.,S.M.E.,M.P

Comité Científico del Workshop/Editores de este libro:

Javier Hermoso de Mendoza Salcedo

José Manuel Benítez Medina

Remigio Martínez Pérez

Unidad de Patología Infecciosa, Departamento de Sanidad Animal, Universidad de Extremadura

Ana Balseiro Morales

Unidad de Histología y Anatomía Patológica, Departamento de Sanidad Animal, Universidad de León

Ana Botelho

Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P., Portugal

Texto y fotografías: Autores

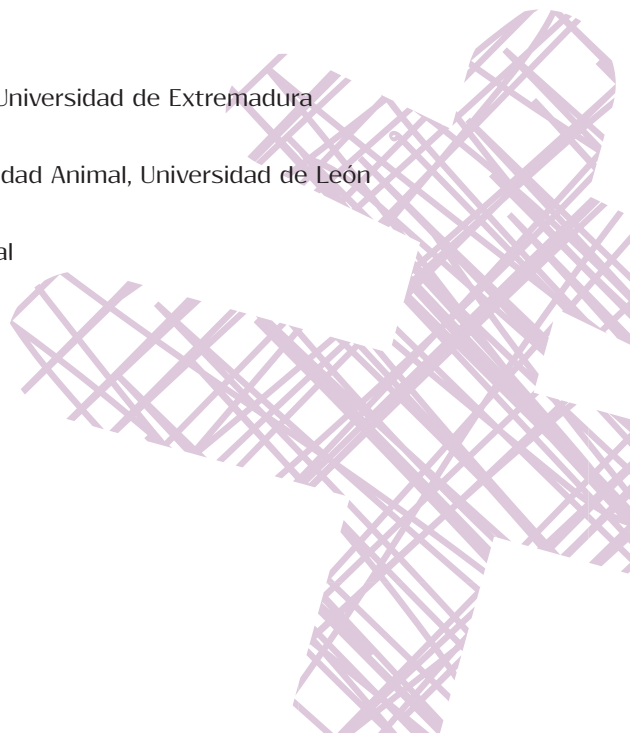
Diseño y maquetación: TRAGSATEC S.A.,S.M.E.,M.P

ISBN: 978-84-491-1554-7

NIPO: 003192408

Depósito Legal: M-25393-2019

Impreso en España - Printed in Spain



ÍNDICE

| | | | |
|--|-----------|--|------------|
| 1. AGRADECIMIENTOS | 5 | F. <i>Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), Institut de Recerca y Tecnología Agroalimentàries (IRTA)</i> B. Pérez de Val | 58 |
| 2. PRÓLOGO | 7 | G. <i>Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (NEIKER)</i> J. Garrido, M. Barral, I. A. Sevilla. | 62 |
| 3. PONENCIAS GENERALES. | 8 | H. <i>CIBIO – Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos da Universidade do Porto. InBIO – Rede de Investigação em Biodiversidade e Biología Evolutiva</i> N. Santos, J. Queirós | 65 |
| A. <i>A modo de introducción: Puntos críticos a los que se enfrenta la administración en la erradicación de la tuberculosis</i> C. Sanz Jiménez, J. Sáez Llorente | 8 | I. <i>Centro de Investigação em Ciência Animal e Veterinária (CECAV) da Universidade de Tras-os-Montes e Alto Douro (UTAD)</i> M. Vieira-Pinto | 68 |
| B. <i>As novidades da Lei da Saúde Animal, Acto delegado de vigilância, erradicação e estatuto livre e Acto delegado de movimentação animal</i> Yolanda Vaz | 14 | J. <i>Departamento de Biología e CESAM, Universidade de Aveiro</i> C. Fonseca, J. Carvalho, R. Tinoco Torres, A. Valente | 71 |
| 4. PONENCIAS CIENTÍFICAS | 16 | K. <i>Grupo de Investigación de Histología y Patología Animal (HAP), Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria (IUSA)-ULPGC</i> M.A. Andrada | 74 |
| A. <i>Vacunas frente a tuberculosis animal</i> F. Javier Salguero | 16 | L. <i>Laboratorio de Referencia Europeo de Tuberculosis Bovina (EU-RL)</i> L. De Juan Ferré | 77 |
| B. <i>Diagnostic tests for bovine tuberculosis: the tuberculin skintest</i> Douwe Bakker | 20 | M. <i>Sanidad y Biotecnología (SaBio), Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos IREC (Universidad de Castilla – La Mancha y CSIC)</i> C. Gortázar | 80 |
| C. <i>Wild boar management for population and sanitary control: an European perspective</i> Oliver Keuling | 27 | N. <i>Grupo de Investigación del Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Universidad Complutense de Madrid (UCM)</i> J. Álvarez | 84 |
| 5. PONENCIAS DE LOS GRUPOS DE INVESTIGACIÓN | 37 | O. <i>Grupo de Investigación de Patología Infecciosa Veterinaria - Red de Grupos de Investigación de Recursos Faunísticos - Universidad de Extremadura (UEX)</i> J. M. Benítez-Medina, R. Martínez. | 87 |
| A. <i>Grupo de Investigación en Sanidad Animal de la Universidad de Córdoba</i> I. García Bocanegra, M. A. Risalde Moya, D. Cano Terriza, A. Arenas Casas, S. Jiménez Ruiz, J. Paniagua Risueño, J. M. Díaz Cao y J. Caballero Gómez | 37 | 6. CONCLUSIONES | 93 |
| B. <i>Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA); Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria de la Universidad de León</i> A. Balseiro Morales | 42 | 7. BIBLIOGRAFÍA | 101 |
| C. <i>INIAV, I.P. - Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, Unidade Estratégica de Investigação e Serviços em Produção e Saúde Animal</i> M. V. Cunha, A. C. Reis, A. Pereira, B. Ramos, T. Albuquerque, A. Botelho | 46 | 8. LISTADO DE PARTICIPANTES | 122 |
| D. <i>Unidad de Inmunología Microbiana. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)</i> J. A. Infantes Lorenzo | 50 | 9. ANEXOS | 128 |
| E. <i>Grupo de Epidemiología del Departament de Sanitat i Anatomia Animals (UAB) y del CRESA-IRTA</i> A. Allepuz | 53 | | |



AGRADECIMIENTOS

El “I Workshop Ibérico y II Nacional de Investigación en Tuberculosis” y el presente libro han sido posibles gracias a la participación de todos los grupos españoles y portugueses que investigan actualmente en tuberculosis, las administraciones autonómicas y los ministerios de Agricultura de España y Portugal.

También ha sido esencial para el éxito de la reunión, la colaboración desinteresada de tres excelentes ponentes venidos de distintos puntos de Europa, como son los doctores Fco. Javier Salguero, Douwe Bakker y Oliver Keuling.

La ayuda económica de diversas entidades y empresas, cuyos logos aparecen en la contraportada de este libro, y de la Consejería de Medio Ambiente y Rural, Políticas Agrarias y Territorio de la Junta de Extremadura y el Fondo Europeo Agrícola de Desarrollo Regional (Convenio Ref.: 124/16; n.º de expediente 1653999FR020), así como la eficiente intendencia organizativa y de edición de TRAGSATEC S.A., S.M.E., M.P., han sido igualmente indispensables.

Nuestro más sincero agradecimiento a todos ellos.

PRÓLOGO

Cuando a mediados de la década de los años noventa se consiguió erradicar de este país la terrible Peste Porcina Africana, todos los esfuerzos técnicos y financieros de las administraciones y el interés de los ganaderos se centraron en erradicar otras enfermedades como Tuberculosis y Brucelosis Bovina, Brucelosis Ovina y Caprina, Leucosis Bovina y Perineumonía Contagiosa Bovina, que eran objeto de las Campañas de Saneamiento Ganadero.

Ciertamente los avances que se experimentaron fueron notables y prueba de ello es que salvo la primera enfermedad el resto pueden considerarse hoy prácticamente erradicadas de España.

En lo que respecta a la Tuberculosis Bovina, el avance en el control y erradicación ha sido más lento e irregular en el conjunto del Estado, y desigual en razón de la situación de las Comunidades Autónomas, pero a pesar de ello se consiguieron entre los años 2010 y 2012 las prevalencias nacionales más bajas de la historia de la erradicación de esta enfermedad, en torno al 1,30% de las explotaciones investigadas. En esas mismas fechas se llega en Extremadura igualmente a la prevalencia menor histórica del 3,04% advirtiéndose ya en ese momento una concentración de la enfermedad en las comarcas donde las especies cinegéticas convivían estrechamente con los rebaños de ganado vacuno.

A partir de ese momento se pone en evidencia un fenómeno que ha sido general en toda la zona sur peninsular con un rápido y demoledor incremento de prevalencia en las explotaciones bovinas, ligado al fenómeno de mayor densidad de población salvaje y a la colonización por ella de nuevos espacios.

Esta expansión de la enfermedad, tanto en las especies cinegéticas como en domésticas, nos lleva preocupando y ocupando en los últimos cuatro años a las administraciones y sector ganadero, y ha sido un reto afrontar múltiples medidas para revertir la dinámica de la enfermedad. Medidas que en muchos casos eran impensables años atrás, o incluso en este momento en otras zonas del país donde exclusivamente con la aplicación de las técnicas de diagnóstico del manual comunitario se está consiguiendo la declaración de áreas libres.

Por ello, es absolutamente imprescindible el desarrollo de Workshops dedicados a Tuberculosis Bovina como el celebrado en Cáceres donde los investigadores, los responsables técnicos de los programas de erradicación, laboratorios, empresas, gestores medioambientales y de la caza, así como los representantes de los ganaderos, sean capaces de dar respuestas a nuevas situaciones que requieren, sin duda, soluciones más complejas pero absolutamente necesarias en beneficio de la Sanidad Animal y Pública, de la economía de este país y de los sectores implicados.

Muchas gracias a todos los participantes, ponentes y patrocinadores por el gran esfuerzo realizado y por las conclusiones y aportaciones que, sin duda, repercutirán positivamente para cambiar la dinámica de esta enfermedad y avanzar en su control y erradicación.

Antonio Cabezas García
*Director General de Agricultura y Ganadería
de la Junta de Extremadura*

PONENCIAS GENERALES

A

A modo de introducción: Puntos críticos a los que se enfrenta la administración en la erradicación de la tuberculosis

Cristina Sanz Jimenez ⁽¹⁾, Jose Luis Sáez Llorente ⁽²⁾

⁽¹⁾ Servicio de Sanidad Animal. Consejería de Medio Ambiente y Rural, Políticas Agrarias y Territorio. Junta de Extremadura. Mérida (España)
cristina.sanz@juntaex.es

⁽²⁾ Subdirección General de Sanidad e Higiene Animal y Trazabilidad. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid (España)
jsaezll@mapa.es

Introducción

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por micobacterias del Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) que afecta al hombre y gran número de especies animales. En ganado bovino suele cursar de forma crónica, pudiendo tardar años en manifestar sintomatología sin que ello impida que los animales enfermos sean transmisores de la enfermedad desde fases tempranas. El cuadro clínico es inespecífico, caracterizándose por tos, fiebre y pérdida de peso, además de otra sintomatología asociada a la localización de las lesiones.

La importancia de esta enfermedad radica en varios factores, ya que es una zoonosis, pero además no hay que olvidar que la tuberculosis produce importantes pérdidas directas en los rebaños afectados, aspecto quizás algo olvidado ante los escasos animales que presentan sintomatología, sin duda asociado a la elevada presión diagnóstica. Basta recordar viejos tiempos o hablar con un ganadero de caprino afectado por esta enfermedad para constatar su importancia. Una explotación sin calificación sanitaria sufre serias limitaciones a la comercialización de sus productos, pero también una comarca (e incluso país) con elevada prevalencia de rebaños infectados padece consecuencias en el movimiento animal, siendo un factor que cada vez cobra más relevancia.

Es por todo ello que esta enfermedad es objeto de erradicación en todos los países desarrollados, en España con unos modestos inicios desde los años 50, una regulación uniforme desde 1986 y una implantación plena desde principios de los 90. En los últimos 15 años de implementación del programa veníamos observando un descenso sostenido pero moderado de la prevalencia de la enfermedad (% de rebaños positivos) en España, con rebotes puntuales cada 3-5 años. Así, al analizar los datos año a año, tanto a nivel nacional como sobre todo a nivel autonómico, podíamos ver una cierta evolución en diente de sierra (tendencia a la baja, pero con picos y valles) lo que estaba provocando un cierto estancamiento en los descensos de prevalencia.

Punto crítico: infección residual

Esta situación motivó a realizar un estudio detallado de las causas por las que se infectaban los rebaños, basado en una investigación epidemiológica de los brotes de tuberculosis bovina en España entre los años 2009-2011. Este estudio detectó como principal fuente del estancamiento la infección residual. No estábamos detectando correctamente los animales infectados, dejando detrás animales que suponían un constante “alimentador” de la enfermedad e impedía avanzar de manera constante y de acuerdo con el esfuerzo realizado. Además, esta hipótesis se veía reforzada al revisar el método de detección de los brotes, pues la proporción de detección de la enfermedad en matadero era relativamente alta (cerca del 14%).

Por tanto, consideramos a la **infección residual** como **primer punto crítico**. Son variadas las causas que la provocan, pero entre ellas destaca el factor humano. La incorrecta ejecución de las pruebas de campo, por pautas incorrectas o mala praxis en los veterinarios de campo o incluso prácticas fraudulentas en auge para enmascarar los resultados de dichas pruebas (uso de corticoides en pomada o vía subcutánea en la zona de inoculación) contribuye en buena parte a esta infección residual.

Por ello se decidió reforzar el programa de control y erradicación de tuberculosis, mejorando la aplicación de la técnica diagnóstica para lo que se pusieron en marcha las siguientes medidas:

1. Actualización en la formación de los veterinarios de campo con obligación de superar cursos de formación teórico-práctica.
2. Cambios en las rutinas que se habían adquirido a lo largo de los años y que habían ocasionado que la prueba cutánea no se hiciese de acuerdo con el Protocolo Normalizado de Trabajo.
3. Controles oficiales sobre el trabajo de los veterinarios de campo para verificar que continúan aplicando una correcta realización de la prueba y de la interpretación de los resultados.

Un estudio posterior para el período 2014-2016 (Allepuz y Casal, 2018, no publicado) realizado siguiendo la misma metodología, ha demostrado que la decisión de este refuerzo de la campaña de saneamiento fue la correcta, aunque con la consecuencia de que tras mejorar el diagnóstico con el fin de “desvelar” la infección residual, se ha observado el aumento previsible de la prevalencia gracias a la mejora en la detección de la tuberculosis en los chequeos rutinarios. Así, durante este periodo un 81,5% de las nuevas granjas positivas se detectaron en las pruebas de campo, frente al 63,9% del estudio anterior, lo que indica la mayor eficacia de la vigilancia basada en dichas pruebas de campo. Como era de esperar, el porcentaje de detección en matadero descendió hasta el 2,7% (frente al 13,9% del periodo anterior).

No obstante, la infección residual sigue manifestándose como el principal factor de riesgo, sobre todo si le sumamos el impacto que tiene el movimiento de animales de rebaños que, a pesar de ostentar la calificación requerida, carecen de ese estatus real, y que además se puede asociar a prácticas fraudulentas para enmascarar el resultado de las pruebas de movimiento. Los controles oficiales siguen manifestando incumplimientos en la ejecución de la prueba de la IDTB en el campo. Basta con ver el gran impacto en las prevalencias que provoca cualquier cambio en el tipo de veterinario que efectúa las pruebas diagnósticas en una zona (de veterinarios privados a veterinarios de empresas, o incluso de una empresa a otra diferente) para corroborar este hecho.

Punto crítico: interacción con fauna silvestre

Además del resurgimiento de la infección residual como principal causa de los brotes de tuberculosis, el estudio del periodo 2009-2011 reveló otro de los principales mecanismos por los que se infectaban las explotaciones, entre los cuales destaca como causa probable la interacción con fauna silvestre.

Este **segundo punto crítico** reconoce el papel de la **fauna silvestre como reservorio de la enfermedad** en algunas zonas, siendo un obstáculo adicional en la evolución del programa, con el riesgo incluso de que llegue a hacerse endémica en esas zonas.

Este punto crítico es especialmente preocupante en los ecosistemas de producción ganadera extensiva, en los que estarían implicados todos los animales que cohabiten en ese ecosistema y que fueran sensibles a la tuberculosis. En este sentido los riesgos que hay que considerar no son solo los derivados del contacto entre animales reservorios de la enfermedad, sino de la contaminación del medio ambiente en determinadas fincas, dada la gran resistencia de la micobacteria en el medio. Por lo que estaríamos hablando de “infección residual medioambiental” en determinados puntos de las explotaciones que actúan como catalizadores de las especies domésticas y silvestres en diferentes momentos del día.

En estos aspectos están trabajando varios grupos de investigación, avanzando en la identificación de estos puntos, sistemas para eliminar o reducir esta contaminación etc., en definitiva, en el diseño de medidas adecuadas de mejora de la bioseguridad en modelos de producción de extensivo y en los modelos de gestión cinegética.

También podemos ahondar en la importancia de la bioseguridad en la gestión ganadera y cinegética, si se hace referencia a la clara correlación entre las prevalencias y los periodos de sequía, en los que la fauna jugaría un papel aún más determinante en la transmisión de la tuberculosis, o de cualquier otra enfermedad animal en cuya transmisión el hacinamiento sobre un punto de riesgo sea factor determinante.

Era indiscutible por tanto que la erradicación de la tuberculosis requería esfuerzos adicionales en materia de fauna silvestre.

Por estas razones el MAPA y las CCAA publicaron en febrero de 2017 una estrategia específica para el control de la tuberculosis en fauna silvestre, en adelante conocida ya como PATUBES, consensuada a nivel central con el resto de autoridades competentes en materia de medio ambiente y caza y con la autoridad competente en materia de salud pública y seguridad alimentaria.

Dicho Plan se fundamenta en 4 pilares fundamentales: la vigilancia de la enfermedad en la fauna silvestre, la prevención, las actuaciones sanitarias sobre los reservorios y una estrategia de comunicación a todos los interesados.

En desarrollo de estos pilares, se ha modificado el Plan Nacional de Vigilancia en Fauna silvestre, para intensificar la vigilancia y adaptarla en función del riesgo de la provincia y del tipo de explotación cinegética.

Así mismo, en materia de prevención frente a ésta y otras enfermedades se ha publicado en 2018 normativa para el control de subproductos animales no destinados a consumo humano y de sanidad animal, en la práctica cinegética de caza mayor (Real Decreto 50/2018, de 2 de febrero) , con el que se pretende controlar la gestión de los subproductos generados por la caza, para evitar que éstos se abandonen en el campo y sirvan de alimento a carnívoros oportunistas y jabalíes, contribuyendo así a mejorar la situación sanitaria sin comprometer la conservación de especies necrófagas.

Finalmente, y en lo referente a las actuaciones sanitarias se han iniciado consultas preliminares para el desarrollo de un segundo instrumento legislativo, sobre medidas específicas en materia sanitaria en fauna silvestre y su hábitat, previstas en el PATUBES. Se trata de un proyecto de Real Decreto por el que se establece la normativa básica en materia de actuaciones sanitarias en especies cinegéticas y de fauna silvestre en relación con la tuberculosis. Será una norma pionera en la Unión Europea que nos permitirá establecer actuaciones sanitarias en terrenos cinegéticos a aplicar sobre especies silvestres que comparten el entorno natural

con animales domésticos. De esta manera se pretende reducir el impacto significativo que las enfermedades compartidas entre los animales domésticos y silvestres tienen sobre la salud pública, la sanidad animal, la economía y la biodiversidad.

Punto crítico: conflictos entre los sectores y la administración

La sanidad animal, especialmente en las campañas emprendidas para la erradicación de enfermedades, con frecuencia ha supuesto conflictos entre el sector ganadero y las administraciones públicas. Actualmente es el caso de la tuberculosis, enfermedad cuya trascendencia no siempre es percibida dado su curso generalmente crónico y con importantes repercusiones en el movimiento pecuario y con un diagnóstico complejo.

Las medidas contempladas en el programa de erradicación generan **conflictos entre algunos sectores y la administración**, lo que consideramos como **tercer punto crítico**. Aunque objetivamente llevamos menos años luchando contra la tuberculosis que el tiempo que tardaron la mayoría de los países en declararse libres, los ganaderos perciben que llevamos haciendo campañas de saneamiento “toda la vida”, además en este momento nos encontramos con dos situaciones difíciles de explicar, en algunas zonas se está produciendo un incremento de la prevalencia y en otras, en las que están más avanzadas, hay una escasa correlación entre los animales diagnosticados como positivos y los hallazgos de matadero. ¿Qué explicaciones y mensajes damos ante ambas situaciones?

Hoy se detecta un enfrentamiento cada vez más directo entre el sector y las administraciones sanitarias, probablemente fruto en no pocas ocasiones tanto de una deficiente información ofrecida por nuestra parte como de un exceso de valoraciones oportunistas, en ocasiones malintencionadas y con intereses muy diversos.

Los problemas más evidentes en este momento son:

1. En algunos casos que afectan a todas las partes implicadas, administración incluida, se puede estar produciendo una cierta rutina, basando la campaña en la mera realización de las pruebas y el sacrificio de los positivos.
2. Es difícil motivar a los veterinarios de campo cuando son puestos permanentemente en entredicho y su trabajo es muy infravalorado.
3. En muchos casos los ganaderos, por causas muy diversas, han dejado de realizar las mínimas prácticas de bioseguridad necesarias para impedir la entrada de las enfermedades, entre otras:
 - El control en los movimientos y las garantías sanitarias en las incorporaciones a la explotación, que deberían incluir no solo las enfermedades incluidas en los Programas de Erradicación.
 - Los procesos de limpieza y desinfección, no solo de instalaciones, sino también en los transportes o el personal, sin olvidar un adecuado tratamiento de estiércoles y purines antes de su empleo como abono. En caso de emplear cama caliente, adecuada gestión de la misma.
 - Evitar en lo posible el contacto con animales de otras explotaciones o fauna silvestre, salvo que tengamos las garantías sanitarias suficientes.
 - Emplear sistemas de explotación adecuados, evitando prácticas de riesgo y considerando el bienestar animal como clave en la salud del rebaño.
 - Abandono de programas sanitarios preventivos (desparasitación, programas vacunales, suplementación...).

4. Las organizaciones agrarias, en ocasiones, tratan de rentabilizar el enfrentamiento con las administraciones, para lo cual no vacilan en desacreditar las actuaciones de los Servicios Veterinarios Oficiales aun cuando estos llevan a cabo sus actuaciones de acuerdo con las mejores evidencias científicas disponibles.
5. En la lucha contra las enfermedades en general y en este caso concreto, están implicados por una parte los ganaderos y sus asociaciones y por otra los veterinarios. El problema es que en ambos grupos hay muchos compartimentos y en la mayoría de las ocasiones con intereses diferentes.
6. En el caso de los veterinarios, bien por estar en diferentes lados del problema, bien por falta de formación o bien por estar demasiado comprometidos con el ganadero, se transmiten mensajes contradictorios que contribuyen al descrédito y a la falta de confianza en nuestras actuaciones.
7. No debemos olvidar que estos mensajes los estamos transmitiendo, tanto desde el ámbito de los veterinarios (científicos incluidos) como desde las asociaciones ganaderas, a los destinatarios finales, que son los ganaderos. Por ello es necesario mantener en estos mensajes tanto claridad como coherencia, ya que se los estamos transmitiendo tanto a ganaderos que desgraciadamente padecen la enfermedad y sus consecuencias en sus rebaños, como a otros ganaderos que no la padecen y que son mayoría. No podemos cambiar el mensaje cuando informamos a un ganadero positivo, indicándole que los animales que le han salido positivos son “falsos”, porque al día siguiente seguro que a nadie se nos ocurriría aconsejar a un ganadero calificado que adquiriese animales de esa explotación que tenía animales “falsos positivos”. Si ya es difícil explicarle a un ganadero, que cree haber comprado animales con todas las garantías sanitarias, que en realidad ha introducido en su explotación la enfermedad por dicha compra (al haber sido alguno de esos animales falsos negativos a la pruebas, hecho que puede producirse con cierta probabilidad), mucho más lo sería explicarle que la enfermedad se ha introducido por animales que fueron positivos pero que los consideramos como “falsos positivos”, cuando este es un hecho mucho más improbable. Seguramente ninguno del 97% de ganaderos calificados, si les preguntásemos, estarían dispuestos a incorporar a su explotación esos supuestos “falsos positivos”.

Punto crítico: falsos dogmas

Todas estas situaciones han dado lugar a la aparición de múltiples **dogmas falsos**, que vamos a considerar como **cuarto factor de riesgo**, pero con gran repercusión mediática, ya que circulan por la red llegando a todos los rincones, entre ellos podemos destacar algunos:

1. Los reaccionantes son **falsos positivos**, probablemente el más difundido, que más daño hace y el menos realista de todos. Este se basa en que todo animal en el que no se consigue el cultivo de la micobacteria es que no estaba enfermo y por lo tanto es “falso positivo”.

En este caso, el problema fundamental es de concepto, en primer lugar porque la técnica lo que detecta no son animales enfermos, sino aquellos que han entrado en contacto con la micobacteria y por lo tanto son susceptibles de desarrollar la enfermedad por lo que, dentro de un programa de erradicación, han de ser eliminados con el principal objetivo de evitar la persistencia de la infección en el rebaño y el contagio de rebaños sanos; en segundo lugar porque desde el momento de la infección hasta la aparición de lesiones puede pasar mucho tiempo por lo que debería ser considerado un fracaso el encontrar habitualmente canales con lesiones evidentes en los mataderos.

En este sentido, cuanto más rápido se detecte un animal enfermo más difícil es encontrar lesiones y mejor habrá sido el diagnóstico. Sin embargo, parece que causa más tranquilidad si en el matadero aparecen lesiones, sin valorar que esto sería un fracaso en la detección temprana de animales infectados lo cual probablemente supondría un contagio hacia otros animales de la explotación.

2. “Estaban limpias”, este mensaje lo reciben con demasiada frecuencia los ganaderos en los mataderos y viene a corroborar, para ellos, el dogma anterior. En realidad, en la inspección rutinaria de un matadero no se dispone del tiempo necesario para hacer una disección que permita detectar lesiones de escasos milímetros en uno de los múltiples linfonodos del animal.
3. “Es que el cultivo ha sido negativo”, el cultivo de las micobacterias es complejo y en la práctica se comprueba que un número considerable de animales con lesiones resultan a posteriori “cultivo negativo”. Por el contrario, un número importante de animales en los que no se observan lesiones aparentes acaban siendo cultivo positivo.
4. “La fauna es la responsable de todos los casos, y así no se puede hacer nada”. Es evidente que hay zonas en las que la fauna actúa como reservorio de la enfermedad, sin embargo, es también frecuente que los pastos compartidos y los múltiples movimientos que se realizan sean el origen del problema, algo que no siempre se reconoce. Los principales expertos en fauna silvestre siguen reconociendo al ganado como el principal responsable de la transmisión de la tuberculosis dentro de la especie bovina, y sostienen que, manteniendo medidas de erradicación en bovino, medidas de control en fauna y mejorando la bioseguridad en las explotaciones la erradicación en doméstico es posible.

Conclusiones

A modo de resumen y reflexión final, creemos que independientemente del ámbito profesional donde nos encontremos desarrollando nuestras funciones, los veterinarios debemos tener claro:

- Que estamos luchando contra una zoonosis y que por lo tanto se trata de un problema de salud pública.
- Que, aunque hoy los ganaderos no perciben la tuberculosis como un problema productivo, sólo hay que recordar lo que pasaba hace 20 años o lo que sigue sucediendo en algunos rebaños de caprino infectados y que son totalmente improductivos.
- Que las pruebas diagnósticas tienen sus limitaciones, como en otras enfermedades y que por ello lo que más nos debe preocupar no son los posibles “falsos positivos”, sino los falsos negativos.
- Que con las pruebas de diagnóstico rutinarias han sido capaces de controlar la enfermedad en la mayoría de los países de nuestro entorno.
- Que es imprescindible el apoyo de todos los sectores implicados y especialmente el de los ganaderos, facilitando las actuaciones de las campañas oficiales de saneamiento, pero sobre todo poniendo en marcha medidas de bioseguridad que minimicen el riesgo de contagio de sus explotaciones. Actualmente se está tornando indispensable igualmente el apoyo de otros sectores como el cinegético y de la caza.
- Que desde la administración se debe hacer un mayor esfuerzo de formación y divulgación, tanto entre los sectores (ganaderos, gestores cinegéticos, cazadores...) como entre los veterinarios (administración, investigación, privados, de empresa...), para erradicar esos dogmas que hacen muy difícil el día a día a las personas que realizan las campañas y que dificultan la consecución del objetivo final, la erradicación. ■

As novidades da Lei da Saúde Animal, Acto Delegado de vigilância, erradicação e estatuto livre e Acto Delegado de movimentação animal

Yolanda Vaz

Direção Geral de Alimentação e Veterinária, Direção de Serviços de Proteção Animal
yolanda.vaz@dgav.pt

O Regulamento (UE) n.º 429/2016, designado “Lei da Saúde Animal” (LSA) entrará em vigor em abril de 2021 e visa a implementação da estratégia de saúde animal na União Europeia sob o lema “A prevenção é melhor do que a cura”. Este novo enquadramento legislativo tem como objectivo fomentar uma melhor saúde animal para apoiar uma produção sustentável, o funcionamento eficaz do mercado interno e a redução de efeitos adversos das doenças, e das medidas para a sua prevenção e controlo, na saúde animal, saúde pública e ambiente.

O Regulamento é composto de várias partes sendo que as interessantes para o enquadramento da luta contra a tuberculose bovina são as partes I - Hierarquização de doenças, responsabilidades; II - Notificação e comunicação de doenças, vigilância, programas de erradicação e estatuto de indemnidade e IV – Registo, aprovação, rastreabilidade e circulação, assim como os respectivos atos de execução e delegados associados a estas partes da LSA.

Através do Regulamento de Execução (UE) 2018/1882 da Comissão de 3 de dezembro de 2018, que estabelece uma lista de espécies e grupos de espécies que apresentam um risco considerável de propagação dessas doenças listadas, o complexo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), incluindo *M. bovis*, *M. caprae* e *M. tuberculosis*, é colocado na categoria “B”, correspondente às doenças de erradicação obrigatória em todos os Estados Membros, para as espécies *Bos ssp.*, *Bison ssp.* e *Bubalus ssp.* Para a restante ordem *Artiodactyla* é uma doença com condições inscritas nos certificados sanitários e para os restantes animais da classe *Mammalia* é uma doença de notificação obrigatória.

Assim, a estratégia para o combate à a tuberculose bovina consiste na vigilância ativa, contenção da disseminação e eliminação progressiva dos focos em que os Serviços Oficiais desenvolvem os planos, fazem a sua gestão, implementam as medidas sanitárias e classificam as explorações e as áreas e os Produtores e seus Médicos Veterinários devem cumprir o plano de erradicação e notificar suspeitas destas doenças – estas obrigações estão especificadas nos capítulos 1 e 2, de notificação e comunicação e de vigilância, da parte II da LSA. O capítulo 3 descreve o formato que devem ter os planos de erradicação e o capítulo 4, as condições para chegar ao estatuto livre de CMTB.

O Acto delegado da Parte II complementa os requisitos específicos de atribuição e manutenção de estatuto de indemnidade ao CMTB a um estabelecimento e a uma zona ou Estado Membro.

A Parte IV da LSA apresenta também um Ato delegado sobre requisitos de saúde animal para movimentos dentro da união de animais terrestres e ovos embrionados, o qual apresenta as condições de transporte e de certificação para os ungulados detidos e contém ainda um Anexo IV com os requisitos mínimos para um plano de vigilância do CMTB em outras espécies como os caprinos, camelídeos e cervídeos em cativeiro, para suportar as condições das trocas intracomunitárias destes animais. Um último Anexo refere os métodos de diagnóstico a utilizar para efeitos de certificação que, para o CMTB, consistem nos testes intradérmico da tuberculina (simples ou comparativo e no teste do Gama-interferão. ■

PONENCIAS CIENTÍFICAS

A

Vacunas frente a tuberculosis animal

F. Javier Salguero

Public Health England. PHE Porton. Manor Farm Rd, Porton Down, Salisbury SP4 0JG. Reino Unido

Javier.salguero@phe.gov.uk

Introducción

La tuberculosis bovina continúa siendo una enfermedad de enorme importancia en Sanidad Animal y Salud Pública en todo el mundo (Waters *et al.*, 2012). Además, el rango de hospedadores del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (incluyendo al *Mycobacterium bovis*) es muy amplio, afectando tanto a animales domésticos como salvajes.

Actualmente no hay vacunas registradas para la tuberculosis en bovino, lo cual supone una gran desventaja al no contar con esta medida de control de la enfermedad en esta especie. Los principales problemas que han provocado la dificultad en el desarrollo de las vacunas para el ganado bovino son la protección incompleta de los candidatos vacunales, así como la inferencia por sensibilización con los métodos de diagnóstico tradicionales (Parlane and Buddle, 2015). Estos problemas se podrían solucionar utilizando estrategias de vacunación integradas con otros métodos de control, revacunando con vacunas homólogas o heterólogas y utilizando métodos de diagnóstico asociados que diferencien los animales infectados de vacunados (DIVA) (Buddle *et al.*, 2018). En lo que respecta a las especies salvajes, existen vacunas registradas frente a la tuberculosis (Chambers *et al.*, 2014) y también se están desarrollando estrategias vacunales de forma similar a las empleadas en ganado bovino.

La BCG como vacuna frente a la tuberculosis en bovinos

El bacilo de Calmette-Guérin (BCG) es una cepa vacunal de *M. bovis* viva atenuada, y es la única vacuna registrada para su uso en humanos. Los mecanismos por los que la BCG confiere protección aún son bastante desconocidos. La principal característica de la BCG es la probada seguridad después de haber sido utilizada en numerosos estudios en diferentes especies. La BCG ha sido utilizada en bovinos desde hace décadas con resultados muy dispares, y más recientemente se han realizados más estudios armonizados utilizando la BCG como comparativa con nuevos candidatos vacunales. Los resultados más recientes han demostrado que además de la faceta de su seguridad, la BCG confiere una cierta protección en la especie bovina, sobre todo en estudios de campo (Ameni *et al.*, 2010). La protección ha sido evaluada de forma cuantitativa y cualitativa mediante la evaluación de las lesiones macroscópicas y microscópicas, y la carga bacteriana en diferentes tejidos (Salguero *et al.*, 2017). Esta protección se caracteriza por el descenso en el número y la gravedad de las lesiones tras el desafío con *M. bovis* patógena, además de la disminución en el número de animales con tuberculosis generalizada frente a localizada (Dean *et al.*, 2015; Ameni *et al.*, 2018).

Se han utilizado diferentes rutas de administración de la BCG, entre las que se encuentra la vía oral, parenteral pero también la ruta en mucosas, con resultados variados. Por ejemplo, se ha observado un pequeño incremento en la protección cuando la BCG fue administrada por las vías subcutánea y endobronquial (Dean *et al.*, 2015) pero no cuando se combinaron las rutas oral y subcutánea (Buddle *et al.*, 2018). La revacunación con BCG también ha demostrado resultados muy dispares, incluso negativos en algunos estudios experimentales, pero, en resumen, casi todos los estudios apuntan a una protección moderada.

En el caso de la vacunación con BCG se están desarrollando tests de diagnóstico DIVA para diferenciar los animales vacunados de infectados. Dos antígenos utilizados para ello son ESAT-6 y CFP10, codificados en la región RDI de *M. bovis* patógena y de *M. tuberculosis*, pero no en BCG (Buddle *et al.*, 2018). Otros DIVA tests se encuentran en desarrollo con resultados prometedores en cuanto a especificidad y sensibilidad (Vordermeier *et al.*, 2016).

Vacunas de nueva generación frente a la tuberculosis en bovinos

Dado el resurgimiento de la tuberculosis bovina en numerosos países desarrollados, junto con el problema de Salud Pública de enorme importancia en países en desarrollo, en los últimos años se han desarrollado numerosos candidatos vacunales, en muchas ocasiones tomando como modelo las nuevas vacunas en desarrollo frente a la tuberculosis en humanos.

Dentro de las nuevas vacunas testadas para la tuberculosis bovina, encontramos las basadas en micobacterias vivas atenuadas, vacunas de subunidades proteicas y de ADN y vacunas de vectores víricos (Tabla 1) (Buddle *et al.*, 2018).

Numerosos estudios han utilizado vacunas basadas en BCG modificada con un aumento significativo de la protección comparándolo con la BCG clásica. Entre ellas destacan la BCG que sobreexpresa el antígeno Ag85B (Rizzi *et al.*, 2012), o mutantes de delección como el $\Delta zmp1$ (Khatri *et al.*, 2014) o cócteles de mutantes de la BCG-Danish (BCG $\Delta leuCD$, BCG $\Delta mmA4$, BCG $\Delta pks16$, BCG $\Delta fdr8$) (Waters *et al.*, 2007).

El uso de vectores víricos ha producido resultados muy prometedores, sobre todo utilizando un método de vacunación “prime-boost” heterólogo, comenzando con BCG clásica y reforzando la inmunidad con vectores víricos expresando el antígeno Ag85A (Dean *et al.*, 2015), de forma similar a lo que se utiliza en vacunas para la tuberculosis en humanos.

Cepas atenuadas de *M. bovis* y de *M. tuberculosis* también han sido utilizadas con variable éxito frente a la tuberculosis bovina (Buddle *et al.*, 2002; Waters *et al.*, 2009; Blanco *et al.*, 2013), al igual que vacunas de ADN (Skinner *et al.*, 2003; Maue *et al.*, 2004) o BCG con adyuvante proteico (Wedlock *et al.*, 2005).

Vacunas frente a la tuberculosis en animales salvajes

La vacunación en estas especies presenta otros retos distintos a los de la especie bovina. Por un lado, la vía parenteral es mucho más difícil de utilizar, por lo que la vía de administración ideal sería oral, mediante la utilización de cebos palatables idealmente para la especie objetivo, que será el reservorio silvestre más común de la tuberculosis en cada escenario epidemiológico específico. Este tipo de vacunas debe tener un margen de seguridad muy amplio, por lo que la BCG ha sido uno de los candidatos más utilizados, junto con cepas inactivadas de *M. bovis* (Tabla 2).

La primera vacuna registrada para uso en animales (BadgerBCGTM) hace tan solo unos años está basada en BCG para tejones en las Islas Británicas (Chambers *et al.*, 2014), siendo esta especie el principal reservorio

salvaje de la tuberculosis animal en esta región. En principio la vacuna fue registrada para su administración por vía parenteral (intramuscular), lo cual supone la captura e inmovilización del animal para recibir la dosis. Este hecho refleja un elevado coste total debido al complejo manejo de esta especie salvaje, mientras que por otro lado proporciona una alta armonización en cuanto a la dosis recibida por animal. La BCG ha demostrado una protección significativa de los tejones frente a la tuberculosis, tanto por la vía oral como parenteral, disminuyendo el número y gravedad de lesiones, así como la carga bacteriana en general.

El principal reservorio de la tuberculosis animal en los ecosistemas mediterráneos es el jabalí. En esta especie se ha utilizado tanto la BCG como cepas de *M. bovis* inactivadas por calor con un alto porcentaje de protección (Beltrán-Beck *et al.*, 2014; Gortázar *et al.*, 2014). En este caso, se han utilizado con éxito las vías de administración parenteral y oral con cebos atractivos y palatables para esta especie en concreto. Ambos tipos de vacunas presentan una serie de ventajas e inconvenientes, como la viabilidad de cepas vivas (BCG) en el medio ambiente junto con la seguridad (inactivación) de los lotes de vacunas, pero han demostrado igualmente unas tasas de protección significativas y muy atractivas para la reducción de la prevalencia de la enfermedad en distintas áreas.

La BCG también ha sido utilizada con éxito para proteger frente a la tuberculosis a cérvidos (Palmer *et al.*, 2009), con resultados menos alentadores en el caso de los hurones en Nueva Zelanda (Cross *et al.*, 2009) y al búfalo africano en Sudáfrica (de Klerk *et al.*, 2010).

Conclusiones

Con los resultados hasta la fecha parece que la BCG podría ser utilizada en ganado bovino para disminuir la prevalencia de la tuberculosis en determinadas regiones donde la estrategia de test-sacrificio no es efectiva o viable económicamente. Con esta medida se podría reducir la prevalencia y el contagio intra e interespecífico. Igualmente, las vacunas de cepas de micobacterias patógenas inactivadas presentan un atractivo interesante sobre todo para su uso en especies salvajes. De cualquier forma, la vacunación per se no puede ser utilizada como una herramienta única sino como una más para ser utilizada en el control integral de la enfermedad. El desarrollo de nuevos tests de diagnóstico es también fundamental para poder distinguir animales vacunados de infectados. ■

Tabla 1. Nuevos candidatos vacunales frente a tuberculosis en bovino.

| Tipo de vacuna | Componente/s | Protección comparada con BCG | Referencia |
|---------------------------------|--|------------------------------|--------------------------------|
| BCG modificada | BCG $\Delta zmp1$ | + | (Khatri <i>et al.</i> , 2014) |
| | BCG sobreexpresando Ag85B | + | (Rizzi <i>et al.</i> , 2012) |
| | Mutantes de BCG | = | (Waters <i>et al.</i> , 2012) |
| <i>M. bovis</i> atenuada | Irradiación ultravioleta | + | (Buddle <i>et al.</i> , 2002) |
| | <i>M. bovis</i> $\Delta RD1$ | = | (Waters <i>et al.</i> , 2009) |
| | <i>M. bovis</i> $\Delta mce2$ | + | (Blanco <i>et al.</i> , 2013) |
| <i>M. tuberculosis</i> atenuada | <i>M. tuberculosis</i> $\Delta RD1 \Delta panCD$ | - | (Waters <i>et al.</i> , 2007) |
| Vector vírico | BCG+ Ad85A <i>prime-boost</i> | + | (Dean <i>et al.</i> , 2015) |
| Proteína adyuvante | BCG+ proteína | + | (Wedlock <i>et al.</i> , 2005) |
| Vacuna ADN | ADN de micobacteria | + | (Maue <i>et al.</i> , 2004) |
| | ADN de micobacteria + BCG | + | (Skinner <i>et al.</i> , 2003) |
| BCG modificada | BCG $\Delta zmp1$ | + | (Khatri <i>et al.</i> , 2014) |

Adaptado de Buddle *et al.*, 2018.

Tabla 2. Vacunas frente a tuberculosis en animales salvajes. Eficacia en estudios experimentales.

| Vacuna y ruta de administración ^a | Ruta de desafío | Especie/país | Eficacia |
|--|-------------------------|-----------------------------|----------|
| BCG / O,M,P | Endobronquial / natural | Tejón / Islas británicas | + |
| BCG / O,M,P | Aerosol / natural | Zarigüeya / Nueva Zelanda | + |
| BCG / O,P | Intratonsilar | Ciervo / EE.UU | + |
| BCG / O,P | Oral | Jabalí / España | + |
| | | Jabalí / España | + |
| | Natural | Jabalí / España | + |
| BCG / P | Intratonsilar | Búfalo africano / Sudáfrica | - |
| BCG / O,P | Oral | Hurón / Nueva Zelanda | -/+ |

^aRuta de administración: O, oral; M, otra mucosa; P, parenteral.Adaptado de Buddle *et al.*, 2018.

B

Diagnostic tests for bovine tuberculosis: the tuberculin skintest

Douwe Bakker

Lelystad, The Netherlands

douwe.bakker@kpnmail.nl

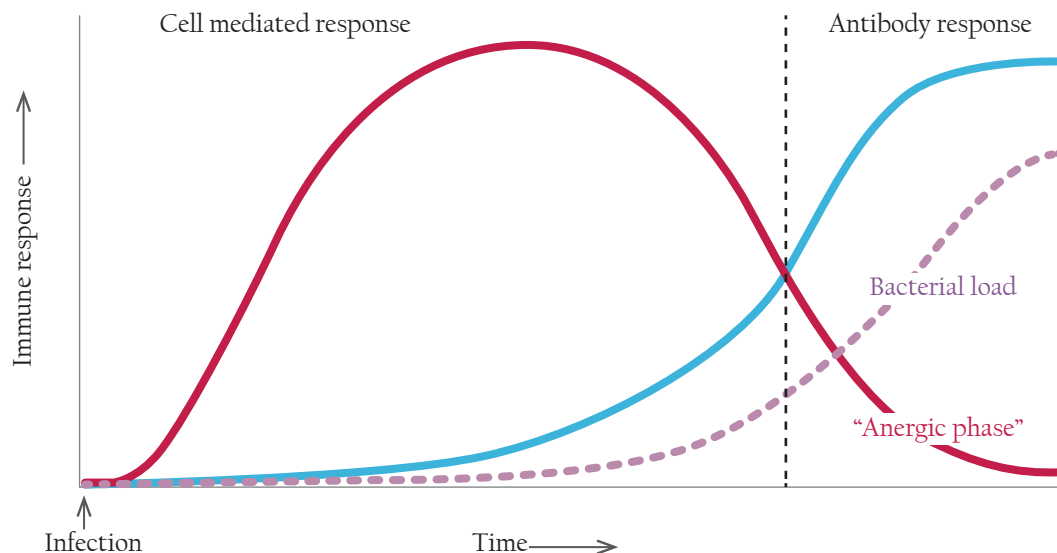
Isolation by culture of *M. bovis* and subsequent speciation by molecular methods is usually considered to be the gold standard for the diagnostic confirmation of tuberculosis in an animal or herd. However, culture and more recently the detection of *M. bovis* by PCR, are in the veterinary field almost exclusively used *post mortem*.

For the ante mortem diagnosis of bovine tuberculosis, the use of immune-based diagnostic assays allowing the detection of the predominant, pre-clinical cell mediated immune response are more appropriate.

The immune response and the diagnostic tools

Immediately after infection, the cell mediated immune (CMI) response is the predominant immunological immune response of the host against mycobacteria (Figure 1). The CMI response is not only a defence mechanism but also responsible for the main symptom of tuberculosis, the formation of the characteristic granulomas. At this first phase, measuring the CMI response, either by skintest, gamma-interferon assay or histology, provides the main diagnostic tool for tuberculosis. Due to the low bacterial load at this stage of infection, routine culture performed at post-mortem of skintest positive animals, will often result in a culture negative status of the animal and not in a confirmation of infection. However, this should not be regarded as a guarantee that the animal is disease free.

Figure 1. The different phases of infection and immune response.



The second phase is also called the “anergic” phase because a loss of a detectable reactivity to the tuberculin tests, resulting in false negatives in the skintest. In this stage, the immune response is dominated by the formation of circulating antibodies, correlates with a severe progression of the disease and is characterized by a large, increasing number of mycobacteria. For this reason, tests, like the ELISA, aimed at detecting antibodies or the direct detection of the bacterium, either by culture or PCR, become the most reliable and sensitive diagnostic tests.

As a consequence, a combination of different tests, representing each category, is often used to diagnose tuberculosis in an animal or herd with an unknown status. Furthermore, in herds where the annual skin test is performed as part of an eradication programme and after one or two rounds of herd testing, few animals with advanced stages of disease will be present in these herds. Therefore, tests aimed at the detection of the bacterium and/or antibodies will rapidly lose their sensitivity and tests aimed at the detection of the CMI response, the skintest and more recently the gamma interferon assay, are to become the most important diagnostic tools in long term certification programmes.

History of the intradermal test

All immunology based diagnostic tests depend on the availability and the use of soluble mycobacterial antigens, either to measure the presence of specific antibodies in the infected host using an ELISA or to stimulate the cell mediated immune response, in vivo using the tuberculin skintest or in vitro using the gamma-interferon assay.

The first mycobacterial antigens were produced by Robert Koch (1891) from cell-free, culture filtrates of mycobacterial cultures, concentrated by boiling, as the so-called “Tuberkulose Heilmittel”, for the treatment of tuberculosis and not for diagnostic purposes. These first attempts were abandoned, however, it was shown to be a very useful as diagnostic tool. Koch noted an exaggerated reaction, nowadays known as the “Koch phenomenon”, that appeared when living or killed *M. tuberculosis* bacteria were inoculated into the skin of previously infected guinea pigs. Koch also observed a similar reaction when his antigen preparation was injected subcutaneously into humans suspected of being infected with *M. tuberculosis*. Non-infected persons did not display such a response. Therefore, it was possible to use this first antigen preparation, or “Koch’s Old Tuberculin (KOT)” as it is called, for diagnostic purposes.

Already in the early 1890’s, Bernhard Bang was the first to recognize the diagnostic applications of the KOT and introduced the intradermal test as the diagnostic tool in the control of bovine tuberculosis in Denmark. The “Bang method” as it was called, consisted of a repetitive, six-monthly, use of the intradermal assay and separating test-positive and test-negative cows, and only culling cattle with “tuberculosis of the udder”. Following reports on the achievements using this approach this “Bang method” was accepted worldwide as the major tool in the control of bovine tuberculosis. This repetitive use of the intradermal assay is still the basis of all control programs for bovine tuberculosis.

Much later, in 1908 the French physician Charles Mantoux developed the intradermal test (or “Mantoux reaction”) into a routine diagnostic procedure for tuberculosis in humans.


In the 1930’s a major improvement in the quality of the antigen preparation was introduced by the work of Florence Seibert in an attempt to identify ‘the active principle of tuberculin’ using dialysis and different precipitation methods. Starting in Weybridge in the late 1940’s, the use of a synthetic medium and improved precipitation methods, facilitated a more reproducible and a large scale production of these so-called PPD (purified protein derivative) tuberculins or PPD’s.

The actual production method developed has not been changed significantly since, making the PPDs the most widely and often used antigens in history.


The intradermal test for the diagnosis of bovine tuberculosis in livestock is based on the use of avian PPD produced from *M. avium* D4ER and on bovine PPD from *M. bovis* AN5. The potency of the PPDs used should be at least 2000 International Units per dose, which is significantly higher than the routine dosage of 5 I.U. used in the human Mantoux reaction.

Despite these improvements, and as reported previously, a comparison of the commercially available PPD's in bioassays, using both guinea pigs and cattle, shows disparity in uniformity of the quality of the avian and bovine PPD's, respectively: whereas the specificity and the potency by weight of the avian PPD's was shown to be relatively constant, the specificity and, in particular, the potency per weight of the bovine PPD's were more variable. If applied in a dose of 1 mg/ml the majority of these tuberculins would not meet the required minimal dose of 2,000 IU.

Figure 2. Comparison of PPDs on the market, presented at the 4th International Conference on *Mycobacterium bovis*. (M. bovis IV). 22-26 August 2005. Dublin, Ireland.



CIDC-LELYSTAD
WAGENINGEN



Department of
Agriculture and
Rural Development

Comparison of commercially available PPD's: practical considerations for diagnosis and control of bovine tuberculosis

D. Bakker¹*, A. Eger¹, J. McNair², K. Riepema¹, P.T.J. Willemse¹, J. Hazegema¹, F.G. van Zijderveld¹ and J.M. Pollock²

¹ Division of Bacteriology and TSF's, Central Institute for Animal Disease Control, CIDC-Lelystad, P.O. Box 2004, 8203AA Lelystad, The Netherlands; ² Veterinary Sciences Division, The Department of Agriculture and Rural Development, Stormont, Stormont Road, Belfast, BT4 3SD, UK.

Introduction

The routine diagnosis of bovine tuberculosis is based on the tuberculin skin test and, more recently, the interferon assay. In eradication programmes, the best results can be achieved by using tuberculins, in general Purified Protein Derivatives (PPD's), with a high potency per weight and a maximum specificity. Even though differences in responses have been frequently reported when different PPD's are being used in both routine screening and eradication assays, little is known about the actual quality of the different PPD's. To obtain more information about the commercially available PPD's, the relative potency and specificity of a large number of PPD's, obtained from different suppliers, were determined against the International Standards of bovine and avian PPD, using bioassays in guinea pigs and by measuring *in vitro* IFN- γ release in PPD-stimulated whole blood cultures from animals experimentally infected with *M. bovis*. The practical consequences for the diagnosis of bovine tuberculosis will be discussed.

Materials and Methods

The potency and specificity of bovine and avian PPD's were estimated using guinea pig assays. For the bovine PPD's, guinea pigs were infected with 0.1 mg wet weight of either a field isolate (*M. bovis* 47119) (Tables 1, 2, and 3) or *M. bovis* AN5 (Table 4), the strain routinely used for the production of bovine PPD. For avian PPD's, guinea pigs were sensitised using a mixture of three *M. avium* strains representing serotypes 1, 2 and 3. The animals received 8 intradermal injections, employing a factorial balanced incomplete Latin square design. The results were analysed statistically using standard methods for parallel line assays.

In *in vitro* IFN- γ release was measured in a group of 5 cattle infected experimentally with 10⁷ CFU of a *M. bovis* field isolate. PPD preparations were tested at 5 days post-infection and 51 days post infection using Evokym (CSI, Australia) test kits. Prior to IFN- γ assay, whole blood cultures were stimulated with PPD, diluted as indicated in Table 4.

Results

For several decades samples of commercially available bovine and avian PPD's have been tested for their potency and specificity. An example of the results of potency testing, mostly performed during the 90's, of 16 bovine PPD's obtained from 11 different suppliers is shown in Table 1.

The relative potency of the tested bovine PPD's ranged from 2,250 International Units (I.U.) per mg to 40,950 I.U. per mg. Therefore, a 20-fold difference in relative potency per mg, could be observed, indicating a significant difference in quality between the PPD's tested.

Not only a large variation between suppliers was observed, also batches from the same supplier showed considerable variation.

In contrast, the results obtained in potency testing of the avian PPD's are far more consistent: only a two-fold difference in potency was measured, as shown in Table 2.

Table 1: Results of potency testing of bovine PPD's in the guinea pig model. All PPD's passed in the specificity test.

| Supplier | I. U. per mg | Supplier | I. U. per mg |
|----------|--------------|----------|--------------|
| A. | 21,450 | A. | 37,500 |
| B. | 40,950 | B. | 81,500 |
| C. | 25,000 | C. | 36,000 |
| D. | 18,450 | D. | 48,500 |
| E. | 10,700 | E. | 50,000 |
| F. | 15,800 | F. | 44,000 |
| G. | 11,700 | G. | 40,500 |
| H. | 12,650 | H. | 28,500 |
| I. | 11,050 | I. | 36,000 |
| J. | 8,450 | J. | 36,000 |
| K. | 3,900 | K. | 50,000 |
| L. | 2,100 | | |
| M. | 7,800 | | |
| N. | 2,150 | | |
| O. | 5,200 | | |
| P. | 2,250 | | |

Table 2: Results of potency testing of avian PPD's in the guinea pig model. All PPD's passed in the specificity test.

| Supplier | I. U. per mg | Supplier | I. U. per mg |
|----------|--------------|----------|--------------|
| A. | 21,450 | A. | 37,500 |
| B. | 40,950 | B. | 81,500 |
| C. | 25,000 | C. | 36,000 |
| D. | 18,450 | D. | 48,500 |
| E. | 10,700 | E. | 50,000 |
| F. | 15,800 | F. | 44,000 |
| G. | 11,700 | G. | 40,500 |
| H. | 12,650 | H. | 28,500 |
| I. | 11,050 | I. | 36,000 |
| J. | 8,450 | J. | 36,000 |
| K. | 3,900 | K. | 50,000 |
| L. | 2,100 | | |
| M. | 7,800 | | |
| N. | 2,150 | | |
| O. | 5,200 | | |
| P. | 2,250 | | |

In most cases avian and bovine PPD's will be obtained from the same supplier and increasing the potency of PPD's by increasing the protein concentration can only be done to a very limited extent.

In Table 3, it is shown that this could lead to an incorrect balance of the bovine and avian PPD, being used in the comparative skin test resulting in the risk of a wrong interpretation.

Table 3: Comparison of potencies of bovine and avian PPD's obtained from the same supplier (I.U. per mg).

| Supplier | Bovine PPD | Avian PPD |
|----------|------------|-----------|
| A. | 21,450 | 37,500 |
| B. | 40,950 | 61,000 |
| C. | 18,450 | 38,000 |
| D. | 10,700 | 10,700 |
| E. | 15,800 | 48,500 |
| F. | 12,650 | 30,000 |
| G. | 11,050 | 44,000 |
| H. | 7,800 | 40,500 |
| I. | 7,150 | 28,500 |
| J. | 2,250 | 50,000 |

In the past year tests were repeated to check if the situation had changed. Again, a large variation in potency of bovine PPD's could be observed. In Fig. 1, two vials of bovine PPD are shown, both produced from strain *M. bovis* AN5, vials were both labeled as 20000 and contains 0.21 mg/ml and 0.85 mg/ml protein, respectively. However, the potency per dose is again remarkably different: 2027 units per dose (left) and 120 units per dose (right). Therefore, a single dose will contain only 6% of the EU minimum required dose of 2000 I.U..




Fig. 1. Two vials of bovine PPD, B 2000, with no apparent differences in production protocols.

At the 'IFN- γ Test for Bovine Mycobacterial Diseases Meeting' in Belfast EU Coordinated Action Workshop (June, 2000; FAIR-CT98-4273) several participants reported differences in field trials when PPD's from different suppliers were used. In Table 4, results are shown of a comparison of four different PPD's in the IFN- γ assay in relation with their potency in International Units.

At day 51 post-infection, all PPD preparations were found to differ in the magnitude of the response, with PPD 1 and 2 giving the highest response at each dilution tested. PPD 3 and 4 showed consistently lower responses with the difference in magnitude ranging between 1.3 and 6. Confirming the above observations.


Table 4: Comparison of various PPD, preparations using *in vitro* IFN- γ release. Results show a day 51 measurement, corrected for OD (optical density) values as given as the mean of 5.

| | PPD 1 | PPD 2 | PPD 3 | PPD 4 |
|-----------|-------|-------|-------|-------|
| I.U./dose | 3547 | 2243 | N.E. | 107 |
| Dilution | | | | |
| 1:50 | 28.9 | 18.3 | 6.8 | 13.8 |
| 1:100 | 15.8 | 8.5 | 2.8 | 2.6 |
| 1:2000 | 2.8 | 4.3 | 1.8 | 1.5 |

Conclusions and discussion

The results of the bioassays show disparity in uniformity of the quality of the avian and bovine PPD's, respectively: whereas the specificity and the potency by weight of the avian PPD's was shown to be remarkably constant, the specificity and, in particular, the potency per weight of the bovine PPD's were highly variable. If applied in a dose of 1 mg/ml the majority of these tuberculins would not meet the required dose of 2,000 I.U.. The potency of the tuberculins could be increased to a limited extent only, since raising the protein concentration may normally affect the specificity. The reason for the variability is not clear; different sources of *M. bovis* AN5, similar to the problems observed with *M. bovis* BCG could be one of the reasons. These findings have great potential implications for the standardization of tuberculosis control programmes between countries and import regulations. Even though the relation between the results between the guinea pig assay and the IFN- γ assay needs further investigation, the variability in PPD's also has implications for use in the IFN- γ test, where these reagents are in common use. Preliminary results indicate that IFN- γ release can be used to compare potency of PPD preparations under controlled laboratory conditions and to highlight differences. Use of animals experimentally infected with *M. bovis* and used as T-cell donors, adds a high degree of consistency to test protocols.

Central Institute for Animal Disease Control (CIDC-Lelystad)
 1 Eindhoven 16, 8219 PH Lelystad
 P.O. Box 2004, 8203 AA Lelystad, The Netherlands
 tel: +31 303 23 81 58
 fax: +31 303 23 81 53
 email: douse.bakker@wur.nl



However, these disparities between PPD's on the market can not only be attributed to the known differences in production methods or production strains used by the respective producers: analyses of the results of multiple guinea pig assays performed on (the same) batches of avian and bovine PPD in the same lab indicate that results can vary between tests and that a (more) careful interpretation of the potency test results is needed.

Moreover, different producers as well as reference laboratories use different testing protocols: e.g. for the sensitization of the guinea pigs, live *M. bovis* AN5, heat-killed *M. bovis* AN5 as well as *M. bovis* BCG are being used, resulting in a difference in potencies as well. This makes it rather difficult for the end users, most of them not having the facilities needed to test for the potencies of the PPD's to assess the actual potencies of the PPD's on the market.

Intradermal test in livestock

The standard method, and the only test prescribed in the EU legislation, for the detection of bovine tuberculosis is the intradermal tuberculin test.

The test can be performed using bovine tuberculin PPD alone or in a comparative test using both bovine and avian tuberculin PPD, called the comparative intradermal tuberculin test. The test is nowadays based on the injection of tuberculin PPD and the subsequent measuring the increase in skin fold thickness (delayed hypersensitivity) using callipers 72 hours later. Clinical signs, such as oedema, exudation, necrosis, pain or inflammation at the injection region should be recorded.

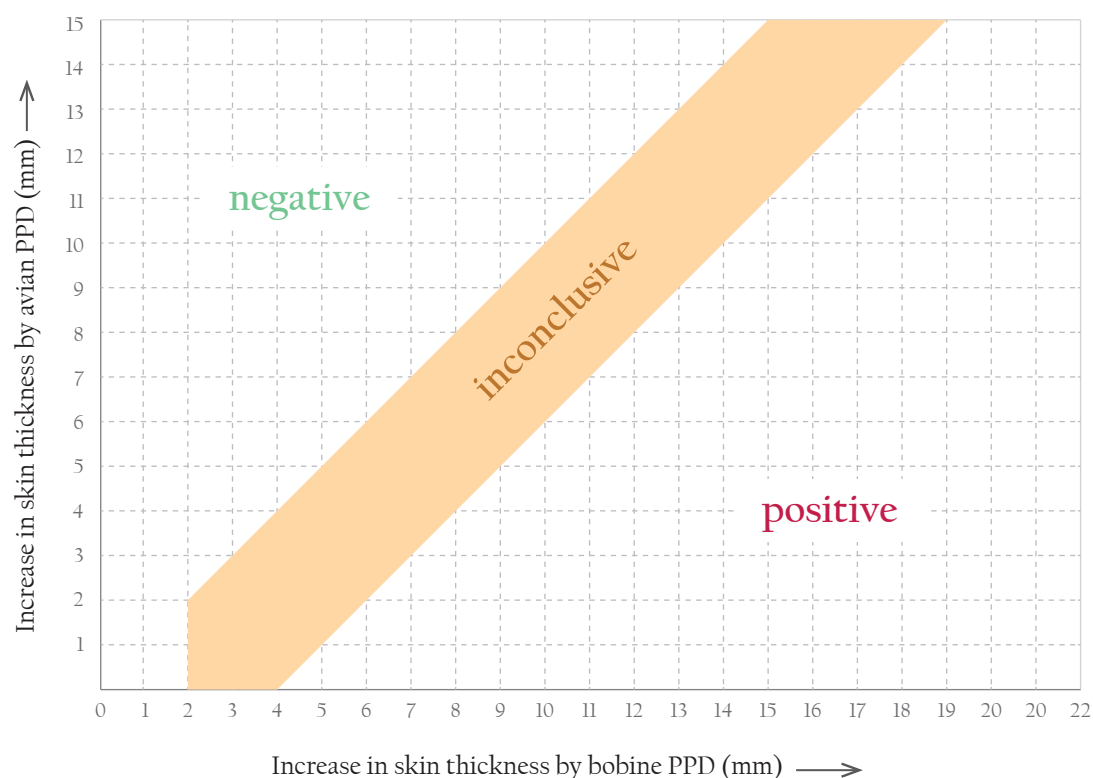
The exact way the testing is performed, preparations of the PPD tuberculins, the strength or the potency of the PPD's to be used, as well as the interpretation of the results are described for cattle in the EU trade legislation (64/432, and Annex B.2.2.) as well as in the O.I.E. manual and these guidelines are used for most other animal species as well. The standard interpretation of the comparative intradermal test is shown in **Figure 3**. A severe interpretation of the comparative test, e.g. often used in infected herds, would mean that the inconclusive animals are removed directly from the herd for slaughter. Otherwise, the inconclusive animals should be retested after at least 42 days, if not tested negative, the animals are regarded as positive and removed directly from the herd for slaughter.

The sensitivity of the intradermal test will be significantly influenced by the stage of infection (**Figure 1**). In addition, the specificity of the intradermal test will be influenced by the sensitization of livestock following exposure to saprophytic mycobacteria or due to infection by other mycobacteria, increasingly, by *M. paratuberculosis*. For cattle the first problem has been reported for e.g. in the Republic of Ireland. To compensate for this non-specific response small changes have been made in the potency of the PPD tuberculins that are being used: a bovine PPD of 3000 IU per dose and an avian PPD of 2500 IU per dose have been introduced.

Freedom of disease

When an infected herd is tested at any given moment by any test (or combination of different tests), it is unlikely that all infected animals present in this herd will be detected. This is caused by the fact that it is unlikely that all infected animals are in a stage of infection that would allow their detection (**Figure 1**) and they will be missed in the first round of testing. As a result, the test will have to be repeated for at least a second time to guarantee a certain degree of freedom. The interval between successive rounds of testing is dictated by two parameters. First, the interval should be long enough for the test negative animals to be able to develop a measurable immune response and second, the length of the interval between tests should not allow those animals to become a source of infection and further spread of the infection within the herd. Fortunately, bovine tuberculosis is reported to spread rather slowly within a herd. Therefore, certification schemes for bovine tuberculosis can be based on a repetitive, annual testing using the comparative intradermal test.

Figure 3. Standard interpretation of the comparative tuberculin skintest.



In several countries, including the Netherlands, e.g. at the end stage of the eradication of bovine tuberculosis in the 50's, the single intradermal test was used by applying an injection of a "double" dose of 5000 I.U. to remove the last remaining infected animals. This approach is still recommended as an option in the OIE manual.

At present, when an infected herd is detected the severe interpretation of the single intradermal test is used and all reactors removed. The interpretation is shown in Figure 4: in this severe interpretation, the "inconclusive" reactors (with a 2-4mm response) are regarded as positive as well.

In addition, in areas that are close to eradication of bovine tuberculosis or maintaining their Tb-free status, an even more stringent interpretation of the single intradermal test is used and any measurable, visible or palpable reaction is regarded as positive.

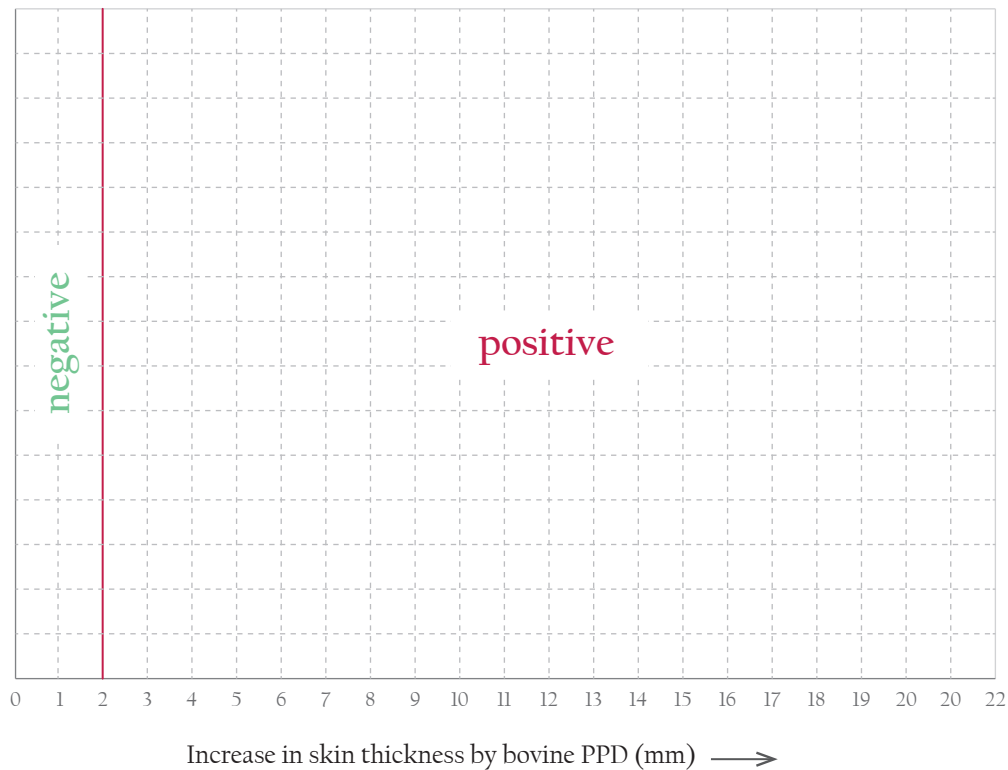
Since the single intradermal test does not take into account a potential *paratuberculosis* infection or other non-specific response, e.g. caused by sensitization by NTM's, the use of this test will result in a significant number of false positives.

And often difficult to explain to stakeholders involved, in particular to the livestock owners, as the eradication of bTB in a herd progresses, all skin test reactors will be recently infected thus confirmation by culture, PCR or histology will result in negative results.

Even worse: in a successful programme, the final skin test reactors will always be true false positive reactors.

Nevertheless, for the eradication of bTB, a highly stringent approach is an essential prerequisite for success: focussing on specificity by using higher cut-offs in the single intradermal test or the comparative intradermal test will decrease its sensitivity and will result in failure of the programme.

Figure 4. The severe interpretation of the single tuberculin skintest.



This is often characterised by renewed herd breakdowns, which can take several years before they occur, and are often blamed, not justified, only on infected wildlife.

In fact, blaming wildlife as sole cause for those recurrent breakdowns will be used as an excuse not to participate in full with BTB control programs, by all stakeholders involved, including farmers, and veterinarians.

Such a lack of compliance will result in a high risk further relaxation of biosecurity and sanitary measures, by both farmers and wildlife management. In addition, farmers and farmers organisations will increase pressure on the veterinary authorities, either directly or via local governments, to reduce the severity of the interpretation of the skin test, which is in many regions/countries already insufficient, by focussing on test specificity and not on test sensitivity, resulting in a further decline of the bTB status of the holdings/regions involved.

This will severely hamper further progress in the control of bTB and, finally, a successful eradication of bTB.

Future options

The tuberculin skin test has been a constant factor in the control of bTB for well over a century, well withstanding alternatives like serology and the IGRA. Serology has been shown to have a very limited sensitivity without prior use of the skin test, due to the so-called anaemnesic rise. Whereas the IGRA, being a test to detect the cellular immune response in animals with bTB as does the skin test, requires a dedicated and costly infra-structure, not available to all, and certainly not in low and middle income, countries.

However, the high variability of the quality of the PPDs and the fact that only a very limited number of manufacturers are able to supply a good quality of PPDs, in combination with an insufficient oversight by

responsible authorities, poses a risk (often unknown to local users of poor quality PPDs) for a successful eradication of bTB.

In addition, in low and middle income countries, a test and cull approach is not feasible. Quite similar, in India, the world's largest dairy producing country, such an approach is not an option either.

For above reasons the Bill and Melinda Gates Foundation is supporting a project to develop a fit for purpose bTB program for these countries (starting in India and Ethiopia) focussed on the use of BCG vaccination in combination with a new DIVA assay and supported by supporting management changes. The DIVA assay will be based on the use of synthetic peptides and should be, at first, replace the comparative PPD skin test.

The use of synthetic peptides would abolish the need for potency testing using the live infected guinea pig model, allowing a quality control by all stakeholders involved, including the end-users and responsible authorities.

Thusfar, the results are quite promising, but a reliable field validation in different geographical areas will still require a considerable effort. ■

Wild boar management for population and sanitary control: an European perspective

Oliver Keuling

Institute for Terrestrial and Aquatic Wildlife Research ITAW, University of Veterinary Medicine Hannover, Bischofsholer Damm 15, 30173 Hannover, Germany

oliver.keuling@tiho-hannover

Abstract

Wild boar *Sus scrofa* populations are still increasing in Europe, not to say worldwide. Small scaled movements and site fidelity allow for regional management units although individuality and flexibility of wild boar requires a real comprehensive and coordinated wildlife management.

Wildlife management is much more than simple hunting. However, hunting may play a major role within a comprehensive wildlife management.

The reproductive rates of wild boar are dependent on nutritional and climatic conditions. Within Europe, they may vary from region to region and from year to year. Nevertheless, reproductive rates are extremely high. Usually the mortality rates (including harvest rates by hunting and a low natural mortality (~5%)) are below reproductive rates, and equal at mean about 80% of the required mortality.

Private hunters conducting hunting as a leisure activity. They have a huge feeling of sustainability and often do not have time and will to shoot more than they need for own “needs”.

To regulate or even reduce wild boar populations additional means are required. Here methods like trapping, reducing food resources, changing hunting laws and hunting abilities and will of hunters, implementing administrative wildlife managers are some of possible options.

Thus, wildlife management means to implement a large-scale administrative management, which has to coordinate management tools and partially to conduct specific means by administrative wildlife managers. Including hunting in a wildlife management means to include hunters will and abilities into management considerations.

However, due to the already high contribution private hunting is an inevitable major part of a larger wildlife management.

Keywords

Sus scrofa, population increase, population ecology, wildlife management, hunting.

Introduction

Wild boar *Sus scrofa* is a recurring topic: the hunting bag statistics –and thus, the population densities– are still rising all over Europe and worldwide (Sáez-Royuela and Tellería, 1986; Massei *et al.*, 2015; Keuling, 2018), although already on a high niveau.

Quite often, hunting is blamed for this phenomenon: e.g., hunters do feed wild boar, hunters do not harvest enough (Schley and Roper, 2003; Cellina, 2008; Saito *et al.*, 2012; Massei *et al.*, 2015). However, hunting investment seems to depend a lot on a psychological phenomenon: it is always “somebody else’s problem” (Keuling *et al.*, 2016b).

Why is there still an increase and spread of wild boar populations? Some points are already discussed in scientific literature:

- Hunting is below reproductive rates (Keuling *et al.*, 2013; Frauendorf *et al.*, 2016)
- Hunters populations are decreasing (Massei *et al.*, 2015)
- Hunters motivation does influence success (Keuling *et al.*, 2016b)

It seems that the occurrence of ASF (African swine fever) is slowly able to induce changes in hunters and “managers” opinions.

However, how can management be conducted? Moreover, how can management include hunting?

Methods

Many of my findings are derived from 20 years of wild boar research. However, a lot of this is not my own merit. During that time, a network of wildlife scientists and managers (often involved deeply in wild boar topics) did develop where many ideas, thoughts, and findings, as well as literature are exchanged and discussed. (VWJD, GWN, IUGB, ENETWILD, EWN, EUROBOAR, wild_boar@yahoogroups.com, International Symposium on Wild Boar and other Suids)

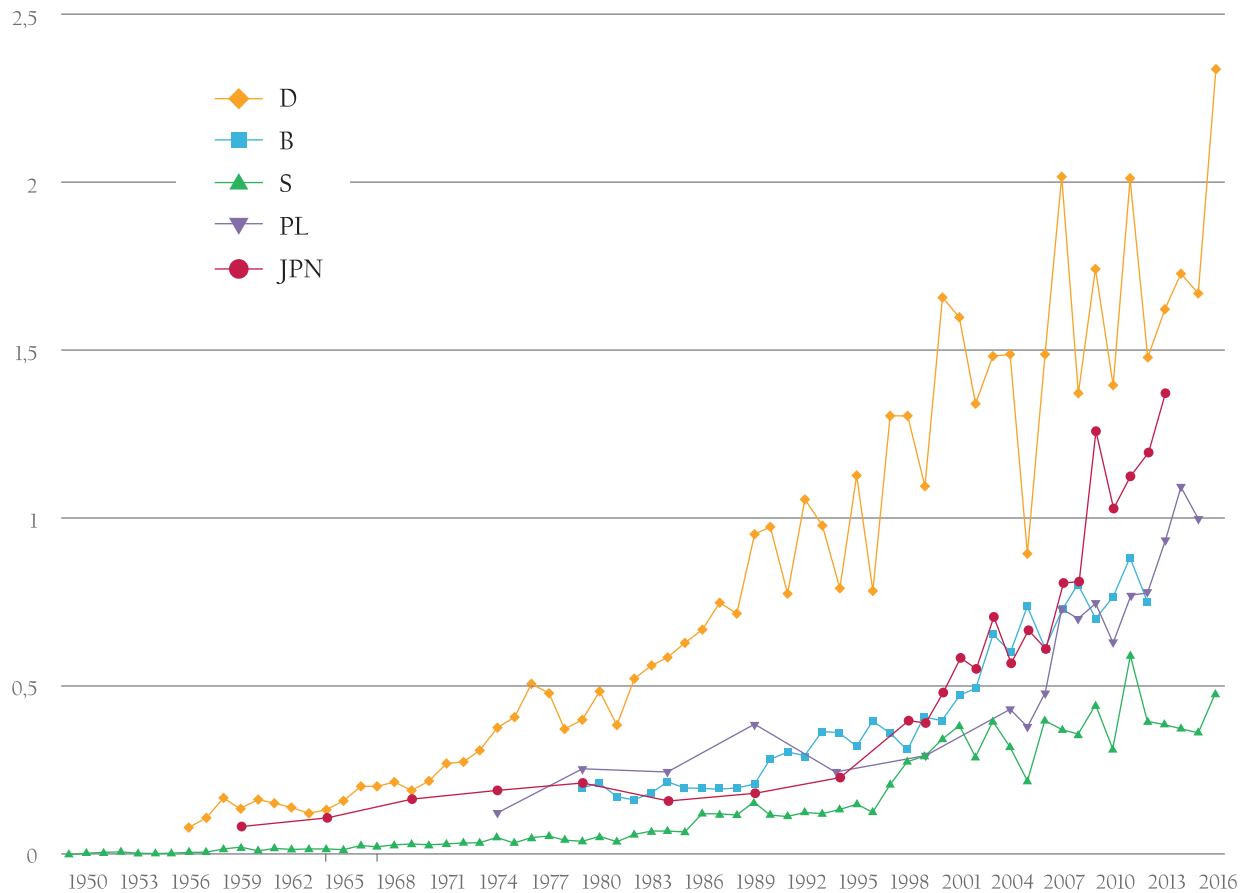
Opinion polls on hunters “will and skill” were conducted within the “Wildtiererfassung in Niedersachsen WTE”, a monitoring system in the Federal State of Lower Saxony, Germany, operated since 1991 by the Hunting Association of Lower Saxony (LJN) in cooperation with ITAW on behalf of the Ministry for Agriculture of Lower Saxony. Every tenant of a hunting ground (9200 private hunting grounds in Lower Saxony) gets a questionnaire which is returned by about 80 %. Here we ask for abundancies, numbers and occurrences of different game species as well as questions on human dimension (Keuling *et al.*, 2016b).

A basis for wildlife management: wildlife ecology

To conduct a solid wildlife management, we need to know about the species. Thus, ecology of wild boar has to be known.

Populations of wild boar are still increasing in Europe and worldwide (Fig. 1). In most regions, wild boar seem to be far from carrying capacity. Within the last decade, this trend was slowing down in some regions of Europe, due to weather effects. In addition, ASF and some management measures in the infected areas have caused regional decreases in population densities. Also some new or newly detected diseases may play a role in lower reproductive rates [e.g. APPV, (Postel *et al.*, 2016; Cagatay *et al.*, 2018)]. In high densities, an epidemic like disease transmission is much more likely.

Figure 1. Trends of hunting bag statistics in some sorted countries in Europe (A Austria, B Belgium, D Germany, PL, Poland) and in Japan (JPN). HI = hunting index => shot wild boar /km².



A wildlife management of wild boar could be conducted on a regional scale: wild boar have small-scaled space use with high site fidelity. Home range sizes range between 150-3000 (seldom more) ha, at mean sounders use 800 ha (Keuling *et al.*, 2008, 2018; Keuling, 2013). In regions with harsh conditions (less food, stronger winters), home ranges are usually larger than in Forest-agricultural mixed landscapes. Within urban areas, home ranges are quite small, sometimes less than 100 ha. Wild boar groups do divide frequently, this behaviour is common and only additionally influenced by hunting pressure (Keuling, 2009, 2013, 2018).

The sensory characteristics and the body shape of wild boar identify the species wild boar as a species belonging to bushland and understorey (Keuling *et al.*, 2018). Thus, wild boar is very well adapted to live in agricultural crops during the vegetation period. In this sense crops like rapeseed are nothing else than a high energetic bushland. Having access to agricultural crops, partially wild boar local populations shift their home ranges to the fields during the vegetation period (Keuling *et al.*, 2008; Keuling, 2009, 2013). Due to its basic needs (food, shelter, water) the wild boar is capable to populate a large variety of different habitats and landscapes (Keuling *et al.*, 2018). In most European cultivated landscapes, all three are available within the range of a wild boar home range. Just in regions that are more southern, sparse water sometimes might become a limiting factor. Intensive agriculture delivers food and shelter during the period of piglet's growth (Keuling *et al.*, 2009). Grassland areas are decreasing, mast years (full fructification of oak or beech trees) are becoming more frequent (Vetter *et al.*, 2015).

Another factor enabling the wild boar to colonise most European habitats are its extremely high reproductive rates (Rosell *et al.*, 2012; Orłowska *et al.*, 2013; Lombardini *et al.*, 2014; Veeroja and Männil, 2014; Šprem *et al.*, 2015; Vetter *et al.*, 2015; Frauendorf *et al.*, 2016; Gamelon *et al.*, 2017; Malmsten *et al.*, 2017) [see also literature in (Keuling *et al.*, 2018)], which are not comparable to other ungulate species! Puberty is starting within the first year of life, due to the very good nutritional conditions (Gethöffer *et al.*, 2007; Ahlers, 2013; Frauendorf, 2015; Frauendorf *et al.*, 2016; Malmsten and Dalin, 2016; Malmsten *et al.*, 2017). Wild boar adapts its reproductive rates on the environmental conditions [r-strategist, or better to say: “fast side of slow-fast continuum”, (Bielby *et al.*, 2007; Keuling *et al.*, 2018)]. Nearly all adult sows and 60 % to 80 % of the female piglets are involved in the annual increase. Highest reproductive rates are achieved in mild climates (e.g. continental North Sea coast) with at mean 200% effective annual increase in Lower Saxony. This means that two third of the summer population have to be harvest (Keuling *et al.*, 2013).

Of course, wild boar see humans as a threat. However, they are adapted to this threat very well: In northern and central Europe, the impact of hunting on the behaviour of wild boar is hardly measurable, seasonal effects and individuality predominate behaviour. Effects of single hunt are within annual home ranges and usual behaviour, whilst other anthropogenic factors are huge. Drive hunts also have little impact, when conducted just once or twice a season. In regions with high hunting pressure (e.g. in Mediterranean countries drives are conducted repeatedly several times on the same area with high pressure). In these cases, and especially with available refuges (areas without hunting), wild boar will alter their behaviour and may swerve large-scaled (Tolon *et al.*, 2009; Scillitani *et al.*, 2010).

Wildlife Management

First, we have to define some terms.

Wildlife management has a comprehensive meaning. Wildlife management has the aim to protect wildlife species, especially by protecting its habitats. Nevertheless, it also aims to protect humans interests. Without the involvement of humans, especially local people, a protection of species does not work. Thus, wildlife management may also include a regulation or even reduction of a wildlife population. Sustainability is one of the major aims.

In short words, wildlife management can be defined with:

- WLM is defined as manipulation of wildlife populations and their habitat
- WLM contains sustainable use
- WLM has an aim
- WLM is centralised
- WLM has to be conducted on population level
- WLM requires human profits and the lack of disadvantage for humans

Within wildlife management we always have to be self-reflecting, also the scientists and wildlife managers may influence wildlife management, and thus, might be a disruptive factor.

Hunting in general is in most parts conducted by private hunters (in few cases by employed professionals) practicing hunting as leisure activity. The majority of hunters is aiming for sustainability (similar to the

German “Hege”), having more or less ethical restriction (also due to hunting and animal welfare legislation). Thus hunter spend their spare time and often a lot of money.

Regulation (sustainable use) means to keep a population on the stable level (defined by humans). On the stable level, annual harvest should equal annual increase (reproduction). Until this defined stable population size, the population has to be reduced or even protected for increase. However, in most cases humans (i.e. hunters) harvest less than needed.

Reduction of a population means to lower a population on a long term to stay stable at a lower level (usually seen as basic winter population).

Thus, we have to ask: Do we conduct management?.

Management ≠ hunting

Thus, we have to state that hunting is not management, although hunters, as well as farmers and veterinarians, do proclaim so. However, hunting may be a part -even an important one- within a comprehensive wildlife management!

What are the reasons for the increase and spread of wild boar populations? Let us look back to the section on biological basis:

Optimal nutrition leads to highest reproductive rates. Due to low natural mortality these immense increases can only be counteracted by sufficient management (Keuling *et al.*, 2013). Thus, there is only hunting as appreciable mortality factor. However, why is hunting not sufficiently regulating wild boar populations?

We have to ask: What are the reasons for these phenomenon?.

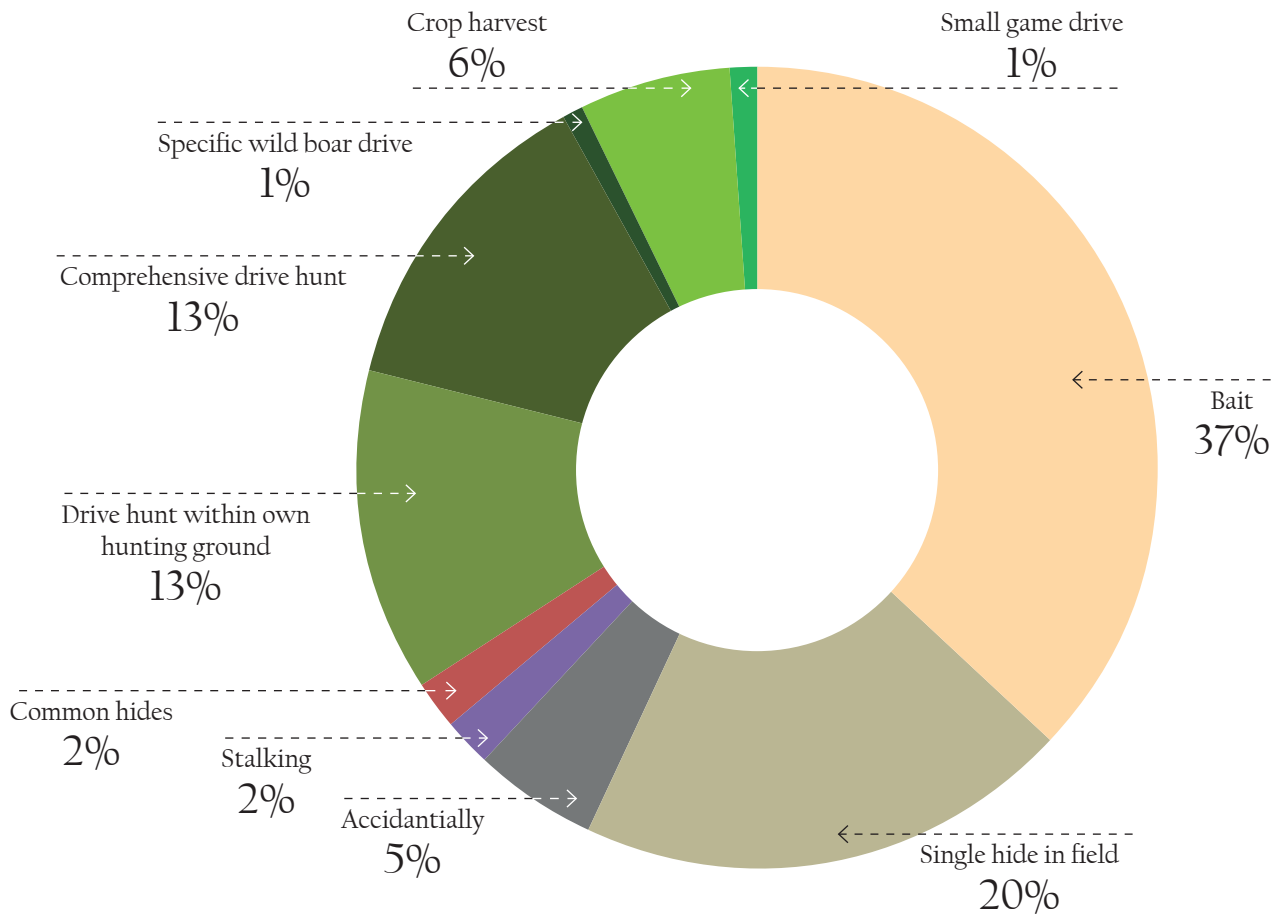
First of all: How efficient is hunting? What are the effective harvest rates compared to increase rates?

If we resume the effective increase of 200 %, the mortality has to be 67 % of the summer population. However, in most part of Europe the mortality rate is just 54 % (Keuling *et al.*, 2013). This means that hunting (and negligible natural mortality) accomplishes only 80 % of the required harvest (annual mean of the last decade). In some years (mostly those with lower reproduction), hunters are approximately able to equal the increase; in other years only 60% of the required mortality is reached (Keuling *et al.*, 2016a).

How do hunters hunt?

Within the wildlife monitoring in Lower Saxony we also asked for the hunting methods hunters used on wild boar. Some of these results may be translated similarly to other regions of Europe. The expenditure hunters pursue for wild boar hunting is huge. The hunters do not miss any opportunity to shoot wild boar (Fig. 2). However, in many cases there are some restrictions due to marketing or animal welfare (no shooting of potential mothers in spring!, no closed season in Germany anymore!!!). Every hunting method is used and has a mentionable proportion within the total hunting bag (Fig. 2). Drive hunts have a high proportion at the hunting bag of Lower Saxony; this proportion was increasing during the last decade by 10%. Baiting plays also an important role, especially in agricultural dominated regions with lower wild boar densities.

Figure 2. Proportions of wild boar shot with specific hunting methods. Source of data: WTE 2010+2011.



Now let us have a look on the hunters' motivation. Why do hunters hunt? What are the paramount motives for hunters to go hunting?.

As aforementioned, hunters usually do hunt as a leisure activity. They do it with lifeblood and passion. They are usually well trained (sufficiently for their own and for animal welfare needs). Main reasons for hunting are:

Sustainable usage of high quality meat, enjoy nature, enjoy friends, protect nature, fulfilling duties due to hunting legislation (e.g. "Hege", population regulation).

Thus, they do not want preferably help other stakeholders in conducting their management aims (disease management, crop protection, population reduction). Sustainability may also hinder a sufficient management, as hunters do want to harvest at least the same amount the next year.

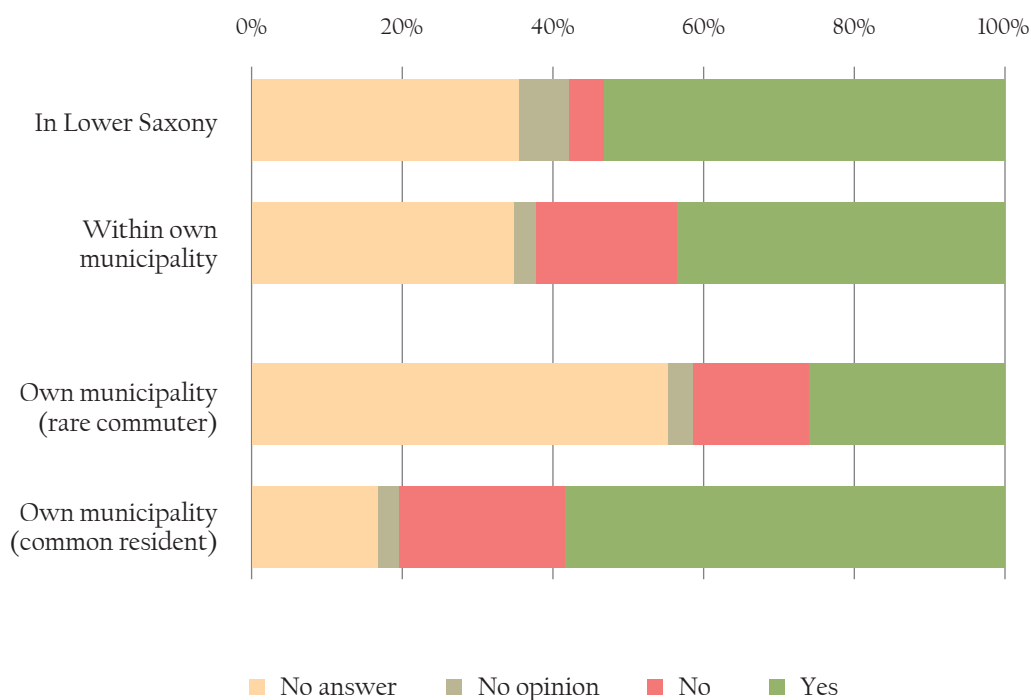
This leads us to another main problem in wildlife management considering hunting as (the only) management tool – the human dimension of wildlife management.

It is always “somebody else’s problem”

The human dimension of wildlife management is a well-known phenomenon (Treves *et al.*, 2006; Decker *et al.*, 2012; Cinque *et al.*, 2013; Marchini and Crawshaw, 2015). Unfortunately, it is hardly studied in Europe (Glikman and Frank, 2011; Frank *et al.*, 2015; Keuling *et al.*, 2016b; von Essen, 2019).

For studying human dimensions, we need to interview stakeholders, need to conduct opinion polls, need to involve social science. I will show you some examples from the WTE from Lower Saxony.

Figure 3. Hunters do believe in the necessity of a reduction in Lower Saxony but not as much in their own region: Proportion of tenants of hunting grounds answering the question “Do you regard reduction of wild boar population as inevitable in...?” Top: total answers in Lower Saxony and bottom: differing proportions for “necessity of reduction in own municipality” specified for municipalities with high and low wild boar densities. N = 8106.



The hunters from Lower Saxony agreed with the statement that wild boar population has to be reduced in Lower Saxony. However, not within the own hunting ground- much less hunters did state that populations have to be reduced within own municipality (Fig. 3). Shooting adult sows is more acceptable than shooting striped piglets (it is seen as “a baby murder”). Many of these survey questions pointed: Hunters are just humans, and in humans, it is a normal behaviour to see things as “somebody else’s problem” (Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5) (Adams, 1982; Keuling *et al.*, 2016b). As we have learned from ASF outbreak in the Baltic states: only own consternation leads to a reaction!

Figure 4. Proportion of hunting ground tenants willing to hunt specific age classes for regulation purposes. N = 8,106.

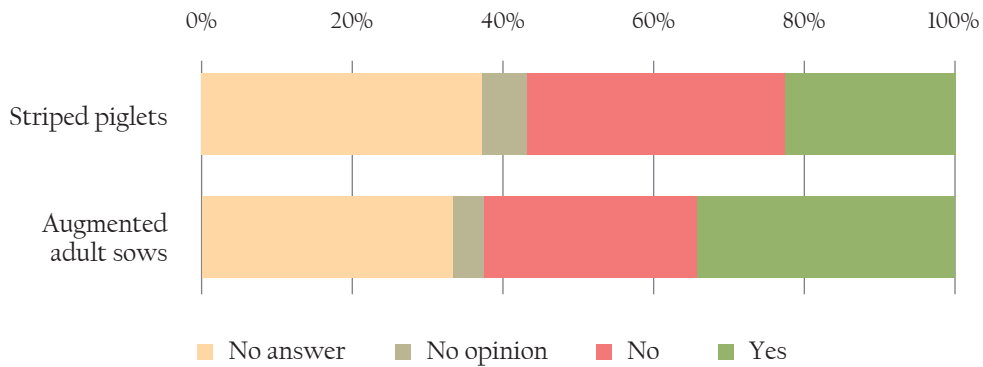
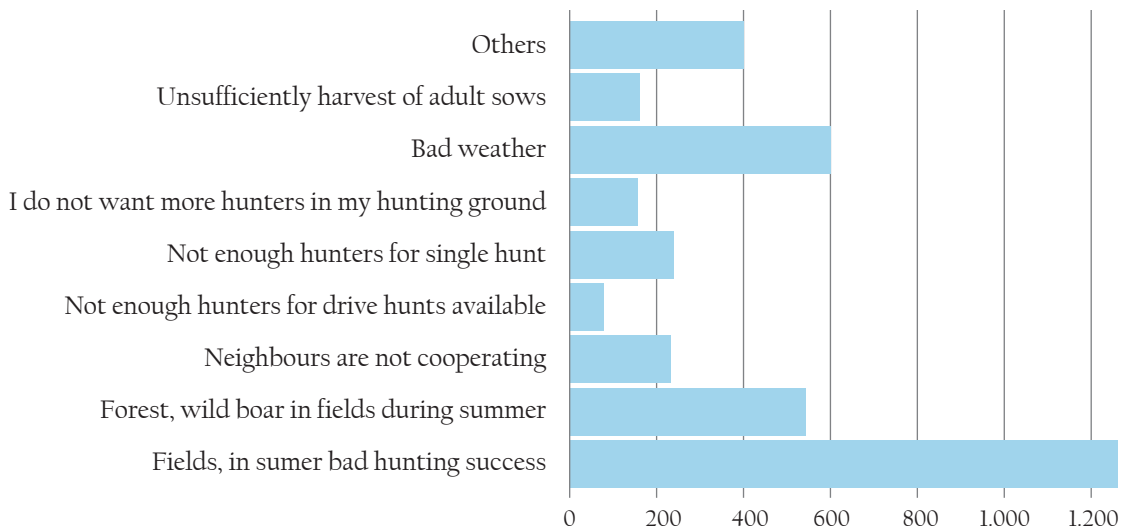


Figure 5. Frequency of positive answers on the question “If you were not able to regulate the wild boar (wb) population: which are the main reasons for not being able to regulate the population within your own hunting ground (hg)?” The answers were predetermined, N = 3646.



How can we improve hunting to be more efficient as a part of wild boar management?

Most important is cooperation and comprehensive hunting beyond hunting ground borders. An increased piglet mortality and increased shooting of adult sows is inevitable. Comprehensive drive hunts are able to increase piglet mortality, whilst adult sows should be preferably shot on single hunt (e.g. at bait). However, in many regions of Europe the hunting habits will have to be therefore changed:

- Shooting all age classes of both sexes (no preferences for more meat or bigger trophies)
- Using drive hunt hides (raised stands) for security reasons
- Positioning hunters close to game crossings within vegetation stock
- Using experienced beaters and dogs of several breeds
- Trained dogs
- Trained shooters
- Implementing marketing infrastructure

Additional techniques

Besides classical hunting some new techniques could help improving hunting efficiency.

Night vision rifle scopes will only be efficient if hunters are willing to use them as top up to the recent hunting bags. Otherwise the same number of saleable wild boar is shot just with lower expenditure. Silencers can also help increasing hunting efficiency by causing less disturbances.

Additional management tools (NO hunting)

Trapping (could partially be done also by private hunters) is also in general an efficient tool. Very often trapping is limited to short periods, restricted areas and specific seasons (lack of resources). For trapping know-how and trained teams are needed. Very often, we could say: the bigger the better. However, animal welfare may become a bottleneck for large traps. You will have to decide how to put animals to death. Persons will also have to be psychologically trained to this culling.

Capturing in combination with shooting of adult sows was very sufficient within some areas in Germany (urban areas, national park) but did not work in an agricultural landscape.

Shooting from helicopters could be conducted in some European countries, however, is very expensive and needs a lot of training. It can only be used as additional tools or in very inaccessible but open landscapes (e.g. swamps). However, the carcass-removal still has to be solved there.

Poisoning is already conducted in Australia and recently started in Texas. However, in densely human inhabited Europe this seems hardly possible. The wild boar scientists in Europe do not believe in any politicians willing to dare using poisons. Recent legislations and the danger of poisoning other animals or even humans (think of children) will not allow for these possibilities.

Contraception is only efficient as immunocontraceptive vaccination. However, as long as this is not conductible as oral vaccination, this might only be a tool for a long term monitoring in urban areas, where shooting is impossible and human inhabitants reject killing captured animals. On a large scale GnRH-vaccination is just a drop in the ocean.

Thus, for a successful management we do not need changed hunting methods or additional management tools. Finally, we need to consider the human dimension within wildlife management. Thus, we also have to incorporate knowledge about will, motivation and abilities of hunters into our management considerations. Hunting, which takes part more or less area-wide and already contributes a huge part to population regulation (management) (Keuling *et al.*, 2013), offers a big potential. A comprehensive wildlife management in Europe, especially in wild boar, could be constructed on this basis. However, the administrative part and the remainders of harvest have to be contributed and coordinated by the governments. In addition, the most important tool for wildlife management is monitoring (Keuling *et al.*, 2018).

Conclusion

Wildlife management is only conductible on a large scale! Hunting can just be one (but important) part within management.

Management concepts will have to incorporate the human dimension! Regional differences in wildlife's behaviour, geography, managers' and hunters' willingness and abilities may lead to different strategies or sizes of game management units. We have to keep in mind that hunting is a time-consuming leisure activity, aiming for sustainability.

Incorporated hunting (within comprehensive wildlife management) could be optimised by combined hunting methods adapted to specific needs (regional wild boar populations and landscapes, local hunters' opinions, kind of disease we are aiming for) beyond hunting ground borders. We need to convince and motivate hunters to change hunting techniques, aimed individuals and raise annual harvest quota. But we must not put the screws on hunters.

Wildlife management is a governmental duty. Private hunters can only contribute, authorities will have to coordinate and conduct the remainder. Therefore, authorities will have to install professional hunters and wildlife managers on regional administrative levels.

Acknowledgement

Thanks to all colleagues for the permanent discussions, to all involved forestry offices, hunting ground tenants and individual hunters for help, cooperation, tolerance and discussion, and to all field assistants. ■

In memory of Dr. Hinrich Zoller. Thank you Hinrich!

PONENCIAS DE LOS GRUPOS DE INVESTIGACIÓN

Grupo de Investigación en Sanidad Animal de la Universidad de Córdoba

Ignacio García Bocanegra

nacho.garcia@uco.es

www.uco.es

A

Historia

El grupo de Sanidad Animal de la Universidad de Córdoba (SA-UCO) está constituido por un equipo multidisciplinar de investigadores e investigadoras adscritos a dos grupos del Plan Andaluz de Investigación, Desarrollo e Innovación: grupos PAIDI AGR-149 “Enfermedades Infecciosas” y AGR-262 “Inmunopatología de animales domésticos, silvestres y exóticos”. Desde hace más de tres décadas, este equipo viene desarrollando diversos estudios centrados principalmente en la epidemiología, diagnóstico y control de enfermedades infectocontagiosas de interés en sanidad animal, salud pública y conservación. En los últimos años, hemos desarrollado, siempre en colaboración con otros grupos de investigación, diversos proyectos y contratos de investigación relacionados con la tuberculosis animal en especies domésticas (rumiantes y camélidos) y silvestres (ungulados y pequeños carnívoros).

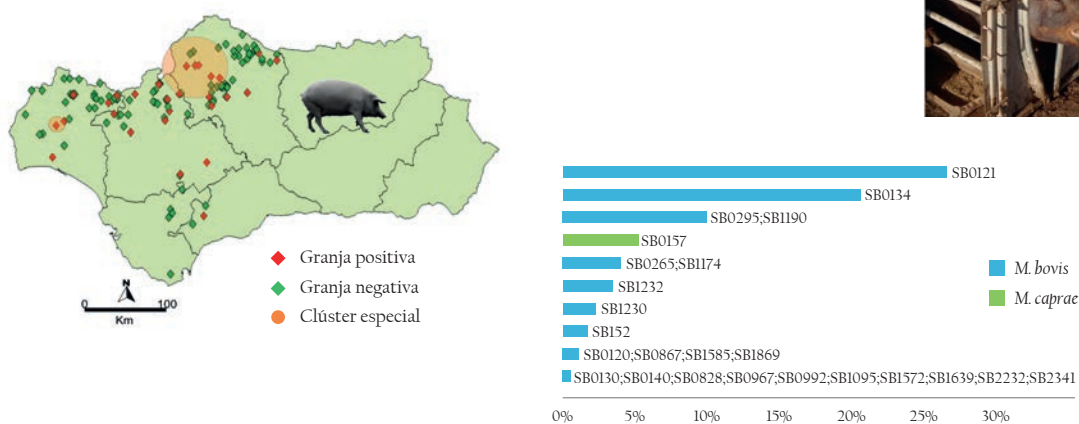
Los trabajos realizados previamente por el grupo SA-UCO se enfocaron en describir casos de tuberculosis en alpacas (*Lama pacos*), en evaluar la distribución espacio-temporal de la tuberculosis en jabalí (*Sus scrofa*) en España y en determinar la prevalencia y factores de riesgo implicados en la transmisión de esta enfermedad en ungulados silvestres en ecosistemas mediterráneos del sur de España. Los resultados obtenidos mostraron una elevada susceptibilidad de las alpacas a la infección por micobacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT) (García-Bocanegra *et al.*, 2010). También se confirmaron infecciones en diferentes especies de ungulados silvestres en Andalucía, identificando una elevada circulación en las poblaciones de jabalí. Así mismo, estos estudios permitieron evaluar la utilidad de técnicas inmunoenzimáticas en el diagnóstico de la enfermedad en estas especies e incorporar información sobre los espigotipos más prevalentes en Andalucía.

Actualidad

Más recientemente, el grupo SA-UCO ha realizado varios estudios sobre tuberculosis enmarcados dentro de un proyecto de investigación nacional coordinado con el Centro de Investigación en Sanidad Animal (CReSA), titulado: “Epidemiología de la tuberculosis bovina: factores de riesgo, aspectos sociológicos, papel de otras especies y eficacia de las medidas de control” (AGL2013-49159-C2-2-R). Los principales objetivos desarrollados incluyen:

- Conocer la prevalencia y distribución espacial de la tuberculosis en el porcino extensivo en Andalucía y determinar factores de riesgo potencialmente implicados en la transmisión del CMT en esta especie. Los resultados obtenidos detectaron una baja seroprevalencia individual (2,3% de 3.622 cerdos analizados), lo cual sugiere que el porcino manejado bajo sistemas de producción extensivos podría actuar como hospedador accidental más que como un verdadero reservorio de tuberculosis. Sin embargo, la elevada prevalencia de explotación (24,8% de 129 explotaciones analizadas) y la presencia de espilogotipos compartidos con otras especies domésticas y silvestres, ponen de manifiesto la necesidad de evaluar, según la situación epidemiológica y los métodos de diagnóstico oficiales disponibles, la posibilidad de incorporar sistemas de vigilancia en estas explotaciones extensivas.

Figura 1. Toma de muestras en cerdo ibérico mediante punción del seno venoso oftálmico. Distribución de las explotaciones analizadas y frecuencia de espilogotipos aislados en porcino extensivo en Andalucía.



- Monitorizar la prevalencia de tuberculosis y los espilogotipos circulantes en jabalí en Andalucía. Para ello, entre los años 2011 y 2018, se han analizado 1.190 jabalíes de 55 cotos de caza mayor. La elevada seroprevalencia, tanto individual (52%) como a nivel de coto (78%), así como la detección de espilogotipos compartidos con el bovino, confirman el papel del jabalí como principal reservorio de tuberculosis en Andalucía.
- Evaluar la eficacia de la adecuada eliminación de subproductos procedentes de la caza mayor como medida de control de la tuberculosis en fauna silvestre (basada en la implantación de la Orden de 2 de mayo de 2012 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). En este estudio se evidenció que la correcta gestión de los subproductos de caza mayor tiene una consecuencia directa en la disminución de la prevalencia de tuberculosis en las poblaciones de ungulados silvestres, contribuyendo a lograr una reducción del 25% en el jabalí.

- Evaluar la gestión de subproductos procedentes de actividades cinegéticas de caza mayor en puntos de alimentación suplementaria para aves necrófagas (muladares) de Sierra Morena (sur de España). Los resultados obtenidos confirmaron la eficacia de la gestión de SANDACH procedentes de la caza mayor mediante el empleo de muladares autorizados, lo cual favorece la conservación de las diferentes especies de aves necrófagas. La ausencia de jabalí en los muladares monitorizados confirmó la efectividad del cerramiento como medida selectiva frente a este carroñero oportunista. Sin embargo, la detección de otros mamíferos carroñeros oportunistas, como zorro (*Vulpes vulpes*) y lince ibérico (*Lynx pardinus*), supone un riesgo potencial de transmisión de enfermedades, proponiéndose medidas complementarias que refuerzan los métodos actuales de impermeabilización de los muladares.
- Evaluación de la imagen térmica infrarroja (IRT) como herramienta para el diagnóstico de la tuberculosis bovina mediante intradermotuberculinización. Los resultados preliminares han evidenciado que, aunque la termografía en sí no proporciona un diagnóstico preciso de los animales infectados, puede ser una técnica efectiva y rápida de cribado para realizar, posteriormente, un examen más profundo con técnicas más específicas.

Otras actividades de investigación, transferencia y formación realizadas por el grupo de la UCO incluyen:

- Colaboración con el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) en la cesión de resultados y elaboración del informe de resultados incluido en el contrato “Estudio de la seroprevalencia de la tuberculosis en porcino extensivo y de aislamiento de cepas circulantes de *Mycobacterium tuberculosis* complex” (NET12016112).
- Asesoramiento científico-técnico a la Consejería de Agricultura Pesca y Desarrollo Rural de la Junta de Andalucía mediante la participación en Mesas de Sanidad Animal (BOJA nº55 de 20 de marzo de 2012).
- Asesoramiento y análisis de enfermedades dentro del Programa de Vigilancia Epidemiológica de la Fauna Silvestre en Andalucía (NET12017204 y NET12018041).
- Asesoramiento a ganaderos, cooperativas y empresas del sector en materia de bioseguridad en explotaciones ganaderas extensivas con problemas de tuberculosis, presuntamente asociados a las especies silvestres, y en la implantación de programas sanitarios frente a tuberculosis en el ganado porcino (AGL2016-76358-R, NET12018158 y NET12018158).

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:

1. Evaluar el periodo de montanera como factor de riesgo en la transmisión de la TB en el porcino ibérico. Estudio financiado por el proyecto titulado: “Diseño, implantación y evaluación de programas sanitarios para la mitigación del riesgo de transmisión de la tuberculosis en el ganado porcino extensivo” (TB-POR-CEX) (NET12018158).
2. Establecer la prevalencia y dispersión de la TB en el ganado caprino y ovino en explotaciones extensivas en Andalucía. Estudio financiado por el proyecto titulado: “Epidemiología de la tuberculosis bovina: factores de riesgo, aspectos sociológicos, papel de otras especies y eficacia de las medidas de control” (AGL2013-49159-C2-2-R).

3. Describir la riqueza poblacional, estructura genética y las asociaciones entre los distintos espigotipos de TB aislados en las especies domésticas y silvestres. Estudio financiado por el Proyecto de Innovación de Grupos Operativos titulado: “GO-TUBERCULOSIS: TbB Nuevas medidas y técnicas de control de la tuberculosis bovina en Andalucía” (GOP-CO-16-0010. Subproyecto AGR-149).
4. Establecer protocolos de bioseguridad para la mitigación de riesgos frente a la TB en explotaciones de porcino extensivo. Estudio financiado por el proyecto titulado: “Evaluación de protocolos de bioseguridad y de la gestión de ungulados en la transmisión de enfermedades compartidas” (AGL2016-76358-R).

Figura 2. Contactos interespecíficos bovino-porcino y porcino-jabalí. Evidencia de estos contactos en una camada de cerdo ibérico en la que algunos lechones presentan el característico patrón a rayas propio de las crías de jabalí.

Los estudios y proyectos realizados por el grupo SA-UCO han sido posibles gracias a la estrecha colabora-



ción con otros grupos de investigación nacionales e internacionales, administraciones públicas y empresas públicas y privadas, entre ellos: CReSA, Sabio-IREC, VISAVET, Instituto de Salud Carlos III, Universidad de Valdivia (Chile), MAPA, Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible, Agencia de Medio Ambiente y Agua de la Junta de Andalucía, Grupo Solano Veterinaria y Nutrición S.L. ■

Resumen

Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB.

| Campo | Resultado | Aplicación | Referencia |
|---------------|---|---|--|
| Epidemiología | Conocer la prevalencia, distribución y factores de riesgo asociado a la TB en artiodáctilos silvestres en Andalucía | Desarrollo de medidas de lucha para el control de la TB en fauna silvestre | (Boadella <i>et al.</i> , 2011; García-Bocanegra <i>et al.</i> , 2012; Rodríguez-Campos <i>et al.</i> , 2012; Cano-Terriza <i>et al.</i> , 2018a, 2018b) |
| Epidemiología | Conocer la prevalencia, distribución y factores de riesgo de la TB en especies domésticas | Desarrollo de medidas de lucha para el control de la TB en especies domésticas | (García-Bocanegra <i>et al.</i> , 2010; Cano-Terriza <i>et al.</i> , 2018c; Ciaravino <i>et al.</i> , 2018) |
| Diagnóstico | Evaluar y optimizar las técnicas de diagnóstico para la TB | Desarrollo de herramientas para el diagnóstico de la TB en especies domésticas y silvestres | (García-Bocanegra <i>et al.</i> , 2012; Arenas <i>et al.</i> , 2018; Thomas <i>et al.</i> , 2019a) |
| Control | Evaluar y optimizar las medidas de profilaxis sanitaria para el control TB | Desarrollo de medidas de lucha para el control de la TB en especies domésticas y silvestres | (Cano-Terriza <i>et al.</i> , 2018c; Jiménez-Ruiz <i>et al.</i> , 2018) |

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 | Contribuir a los programas de lucha frente a la TB animal en España, y, por tanto, a un uso más eficiente de los recursos disponibles |
| Epidemiología | Evaluar el papel epidemiológico del ganado caprino y ovino en la epidemiología de la TB en Andalucía | |
| Epidemiología | Evaluar el papel del porcino extensivo en la epidemiología de la TB | |
| Diagnóstico | Optimizar las herramientas de diagnóstico de la TB en especies domésticas y silvestres | |
| Control | Diseñar programas sanitarios y de bioseguridad frente a la TB en el ganado porcino extensivo | |

Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA); Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León

Ana Balseiro

abalm@unileon.es

www.serida.org

www.unileon.es

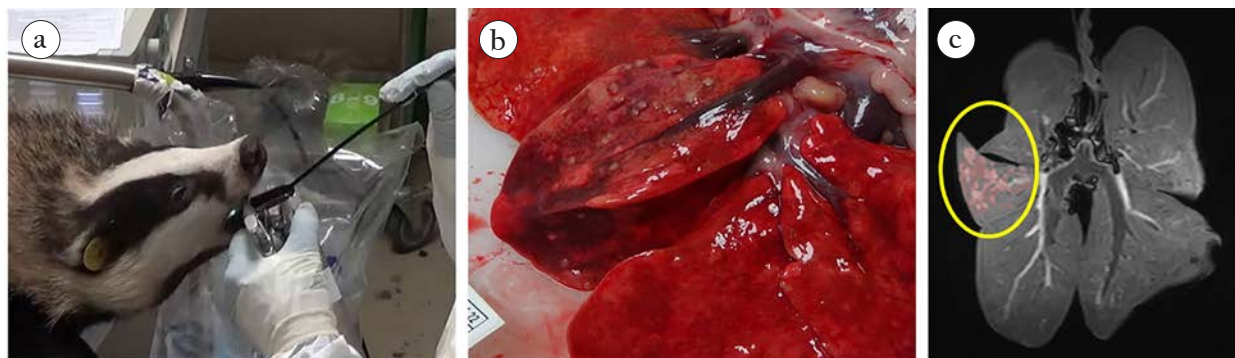
Historia

El Área de Sanidad Animal del SERIDA (www.serida.org) y el Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de León vienen trabajando en la tuberculosis animal tanto en el ganado doméstico como en la fauna silvestre desde hace dos décadas. Dentro del marco de cuatro proyectos de investigación financiados por el INIA se ha profundizado en el conocimiento de la tuberculosis en diferentes especies silvestres (principalmente tejón y jabalí) y en especies domésticas (bovino y ovino). En líneas generales durante los últimos años hemos intentado describir los riesgos de transmisión de la tuberculosis entre el ganado bovino, ovino y las especies silvestres, principalmente, tejón y jabalí, en ambientes atlánticos, aplicándolo al desarrollo de protocolos de mitigación de dichos riesgos de transmisión de la enfermedad.

Actualidad

Se han desarrollado varios objetivos específicos. Por un lado, se ha evaluado la seguridad y la eficacia de dos vacunas antituberculosas – la vacuna viva atenuada *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) y la vacuna *Mycobacterium bovis* inactivada por calor – en corderos y tejones desafiados con *M. bovis*. El desafío experimental de corderos y tejones con *M. bovis* por vía endobronquial reprodujo, tras doce semanas de infección, las principales características inmunológicas, patológicas y bacteriológicas de la tuberculosis activa en condiciones naturales en ambas especies (**Figura 1**). En el caso de los corderos únicamente la vacuna viva atenuada BCG administrada por vía subcutánea confirió protección frente a la infección. En este sentido la vacuna inactivada se administró por vía oral, por lo que factores como el proceso digestivo propio de los ovinos pudo interferir en los resultados negativos obtenidos. En la especie tejón ambas vacunas aplicadas por vía oral confirieron cierta protección frente al desafío experimental con *M. bovis*, en términos de reducción de la severidad de las lesiones en pulmones y nódulos linfáticos respiratorios, así como en la generalización de lesiones a otros órganos. Las infecciones experimentales en corderos y tejones se han realizado en coordinación con CReSA y NEIKER y APHA (Reino Unido), respectivamente.

Figura 1. Momento del desafío con *M. bovis* en un tejón (a). Lesiones tuberculosas en el lóbulo medio derecho detectadas durante el estudio macroscópico (b) y mediante resonancia magnética (c).

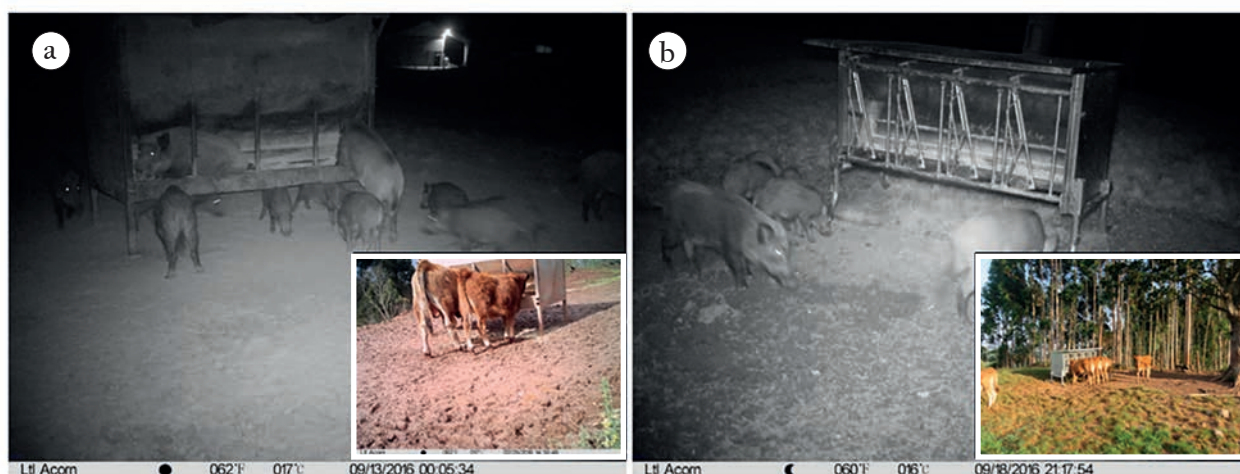


Por otro lado, se ha estudiado la interacción entre fauna silvestre y especies domésticas en el entorno de explotaciones bovinas positivas a tuberculosis mediante la captura y análisis de tejones para determinar su estado sanitario, así como mediante encuestas epidemiológicas, estimas de abundancia y colocación de collares GPS en tejones y jabalíes capturados en áreas cercanas a dichas explotaciones. En el caso concreto del tejón se ha observado una relación estadística positiva en cuanto a presencia de esta especie en el entorno de ganaderías positivas a tuberculosis respecto a las que no lo son.

Por último, se han establecido medidas de bioseguridad específicas en explotaciones bovinas. Concretamente se ha analizado la efectividad de un diseño de comedero selectivo para terneros mediante cámaras trampa, en una explotación en la que los jabalíes accedían de noche al alimento localizado en las tolvas donde sus terneros se alimentaban durante el día (Figura 2). Las imágenes mostraron una reducción del 97.85% y del 56.34% en el número de jabalíes que accedieron a la nueva tolva y en el número de jabalíes alrededor de la misma, respectivamente. En este sentido, las medidas de bioseguridad son herramientas prometedoras, baratas y rentables para prevenir la posible transmisión de la tuberculosis y otras enfermedades, a través de contactos indirectos.

Los actuales estudios se han llevado a cabo con la colaboración de centros como SaBio-IREC, VISAVET, Instituto de Salud Carlos III y Xunta de Galicia y, han sido financiados por el proyecto INIA RTA2014-00002-C02 (cofinanciado por FEDER) y por el Principado de Asturias, PCTI 2018-2020 (GRUPIN: IDI2018-000237) y FEDER.

Figura 2. Antiguo comedero donde accedían los jabalíes (a) y nuevo diseño al cual no pueden acceder (b).



Futuro

En líneas generales se pretende describir los riesgos de transmisión de la tuberculosis entre el ganado bovino, ovino y las especies silvestres, principalmente tejón, jabalí y zorro, aplicándolo al desarrollo de protocolos de mitigación del riesgo de transmisión de la enfermedad.

Para ello se desarrollarán los siguientes Objetivos:

1. Estudio de la interacción entre fauna silvestre y especies domésticas en el entorno de explotaciones bovinas positivas a tuberculosis en Asturias y Castilla y León.

Para ello se marcarán bovinos, tejones y jabalíes con collares GPS que revelen la interacción entre estas especies en explotaciones bovinas positivas a tuberculosis. Adicionalmente se realizará una estimación de densidad de población de tejón en ambas CCAA.

2. Evaluación de la seguridad y la eficacia de vacunas antituberculosas en cebos en tejones desafiados con *M. bovis*. Este objetivo permitirá determinar la eficacia en tejón del prototipo de vacuna inactivada de *M. bovis* utilizando cebos. Este objetivo daría lugar a un avance real en la lucha frente a la tuberculosis en el tejón a nivel internacional. Además, supondría un gran avance en la vacunación de tejones en campo debido a que disminuiría el riesgo biológico de utilizar la vacuna viva atenuada BCG.
3. Diseño de un modelo de infección experimental en zorro con *M. bovis*. Este objetivo, que será coordinado por ANSES (Francia), permitirá evaluar la susceptibilidad, patología y respuesta inmune del zorro a la infección por *M. bovis*, con el fin de arrojar luz sobre su papel epidemiológico en determinados escenarios. ■



Resumen

Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB.

| Campo | Resultado | Aplicación | Referencia |
|---------------|---|--|--|
| Diagnóstico | Diseño de ELISA p22 para el diagnóstico de tuberculosis en tejón | Mejora el diagnóstico de tuberculosis por ELISA en tejón | (Infantes-Lorenzo <i>et al.</i> , 2019a) |
| Epidemiología | Diseño de comedero selectivo para terneros que evite entrada de jabalíes | Identificación de riesgos en bioseguridad ganadera e intervención para mejora de la bioseguridad en explotaciones ganaderas bovinas | (Balseiro <i>et al.</i> , n.d.) |
| Control | Evaluación de la eficacia de vacunas antituberculosas en tejones desafiados con <i>M. Bovis</i> | Evaluación de vacunas y de nuevas herramientas diagnósticas | (Balseiro <i>et al.</i> , 2018) |
| Control | Desarrollo de un modelo de tuberculosis experimental y vacunación en ovino que permite el seguimiento de la respuesta inmune y la evaluación cuantitativa de la patología y la carga bacteriana | Evaluación de vacunas y de nuevas herramientas diagnósticas | (Balseiro <i>et al.</i> , 2017) |
| Control | El ovino es un huésped con desarrollo particular de las lesiones de tuberculosis | Estudio inmunohistoquímico de poblaciones celulares en los granulomas que permitan el conocimiento de la patogenia de la tuberculosis | (Vallejo <i>et al.</i> , 2018) |
| Epidemiología | Identificación de los reservorios silvestres y domésticos más importantes para el mantenimiento de la tuberculosis en ambientes atlánticos | Identificación de riesgos en bioseguridad ganadera Identificación de especies partícipes de la epidemiología de la infección de cara a la aplicación directa del protocolo de erradicación Estimación de abundancia de tejón | (Muñoz-Mendoza <i>et al.</i> , 2013, 2016; Acevedo <i>et al.</i> , 2014; Cowie <i>et al.</i> , 2014) |

Objetivos inmediatos y su beneficio potencial para el control de TB.

| Campo | Objetivo | Beneficio |
|---------------|--|--|
| Epidemiología | Estudio de la interacción entre fauna silvestre y especies domésticas en el entorno de explotaciones bovinas positivas a tuberculosis del norte y centro de la Península Ibérica | Identificación de riesgos en bioseguridad ganadera Identificación de posibles vías de transmisión de la infección entre especies |
| Control | Estudio inmunohistoquímico de poblaciones celulares en las lesiones tuberculosas de tejones infectados con y vacunados con BCG y vacuna inactivada con calor | Evaluación de la respuesta inmune y de la patogenia de la tuberculosis en tejón |
| Diagnóstico | Diseño de ELISA p22 para el diagnóstico de tuberculosis en ovino | Mejora el diagnóstico de tuberculosis por ELISA en ovino |
| Vacunación | Conocer la respuesta del tejón a la administración de inactivado por calor en cebos | Capacidad para administrar de forma selectiva productos por vía oral a tejones, en condiciones de campo |
| Control | Desarrollo de un modelo de infección con en zorro | Estudio de la susceptibilidad y patología de la infección en esta especie Potencial desarrollo de herramientas de control de la tuberculosis en zorro |
| Control | Estudio de la interacción entre especies domésticas y silvestres y diseño selectivo de comederos u otras medidas que minimicen el contacto indirecto | Identificación de riesgos y mejora de la prevención |

INIAV, I.P. - Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, Unidade Estratégica de Investigação e Serviços em Produção e Saúde Animal

Mónica V. Cunha

monica.cunha@iniav.pt

www.iniaiv.pt

História

Em Portugal, a tuberculose (TB) subsiste num sistema multi-hospedeiro constituído por ungulados silvestres e domésticos. A execução analítica dos planos oficiais de controlo de TB em bovinos e em caça maior na área epidemiológica de risco é realizada pelo INIAV, IP, Laboratório Nacional de Referência (LNR), que tem a seu cargo a confirmação laboratorial dos casos suspeitos, baseada em testes histopatológicos, bacteriológicos, moleculares e/ou imunológicos. A par deste apoio, o INIAV tem realizado estudos científicos que permitiram confirmar a circulação enzoótica de *Mycobacterium bovis* em caça maior, com tendência para expansão geográfica além dos limites estabelecidos na área epidemiológica de risco (edital nº 1/2011 da DGAV). Apesar da deteção ocasional do agente noutras espécies, nomeadamente carnívoros Mediterrânicos e aves necrófagas, os estudos realizados permitiram confirmar os bovinos, o javali (*Sus scrofa*) e o veado (*Cervus elaphus*) como os hospedeiros de grande relevância epidemiológica. A modelação matemática de dados de presença-ausência de TB em carnívoros com recurso a métodos estatísticos (GLM, GAM, GBM, MARS e RF) sugere a influência da densidade de veados, densidade de bovinos, percentagem de áreas agrícolas heterogéneas, entre outras, como variáveis de risco para a ocorrência de TB. O INIAV desenvolveu recentemente métodos de diagnóstico molecular, mais sensíveis e expeditos, com base em PCR em tempo real e nanossondas de ouro. Dispõe da maior coleção nacional de *M. bovis* e *M. caprae*, que totaliza cerca de 3000 isolados obtidos desde 2003. Foi pioneiro na caracterização molecular dos isolados nacionais por *spoligotyping* e MIRU-VNTR e tem genotipado, desde 2008, e com regularidade, os isolados oriundos de várias espécies animais do território continental e dos Açores, confirmando a predominância do clone Europeu 2 e identificando vários genótipos e *clades* não anteriormente reportados. Os estudos liderados pelo INIAV permitiram também sustentar a investigação epidemiológica de surtos em explorações e casos de re-infeção após vazio sanitário associados a movimentação. Têm ainda salientado a elevada diversidade genotípica de *M. bovis* nas espécies de ungulados do território nacional e mostrado a existência de genótipos comuns com os de surtos ocorridos em Espanha. A caracterização molecular de *M. bovis* 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 (ZC). A análise Bayesiana baseada em perfis de MIRU-VNTR sugere a presença de cinco populações ancestrais. O INIAV tem ainda colaborado com outras entidades no estudo da dinâmica de movimentos de bovinos de explorações positivas e a sua relação com parâmetros de análise genética e de distância.

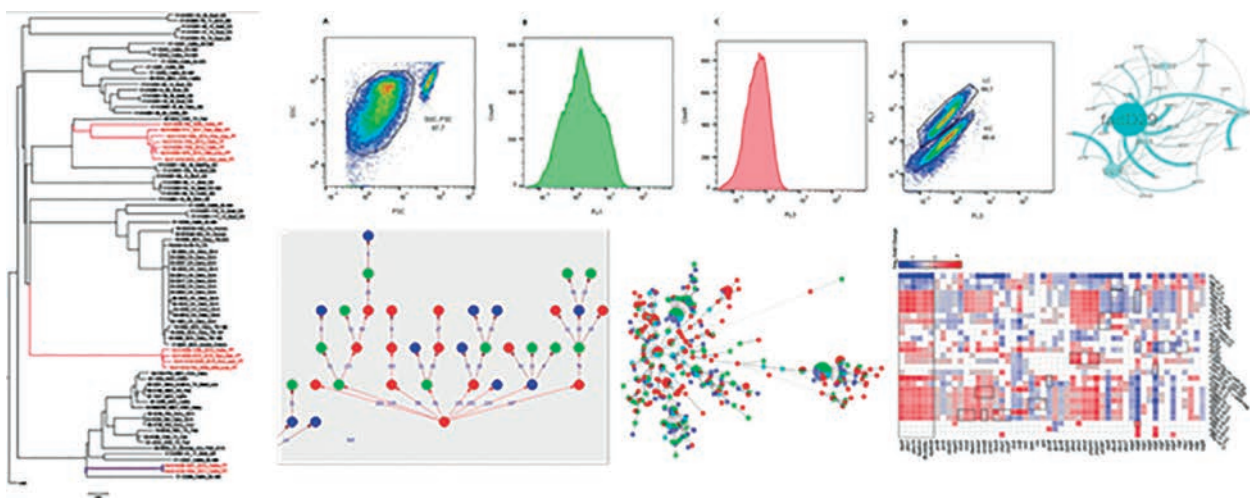
Atualidade

Apesar de grande parte da investigação levada a cabo pelas equipas do INIAV ser aplicada, alguns membros também se dedicam a estudos fundamentais de genómica comparativa e funcional de *M. bovis*, com recurso a análise de dados do transcrito em larga escala (RNA-seq) e construção de mutantes, para elucidar os aspetos regulatórios e funcionais de genes envolvidos na resposta ao stress imposto na interface com o hospedeiro (Projeto MyPATH).

A par com a colaboração regular com entidades oficiais e instituições académicas, os estudos científicos levados a cabo pelo INIAV têm sido importantes para se conhecer e caracterizar a situação da TB no terreno e para que se possam adequar medidas de controlo sanitário às zonas onde comprovadamente *M. bovis* circula. Apesar da mitigação de alguns fatores de risco ao nível das explorações pelo manejo e reforço de medidas de biossegurança, a existência de reservatórios silvestres, as densidades elevadas de algumas populações geridas artificialmente para fins cinegéticos, e a inexistência de uma vacina que proteja eficazmente os animais da infeção, limitam grandemente o controlo de TB. Por outro lado, embora as associações epidemiológicas estabelecidas forneçam informações valiosas sobre a prevalência e ocorrência espacial da TB em áreas onde o javali, o veado e/ou os bovinos são simpátricos, os aspetos determinísticos da transmissão entre bovinos, entre ungulados silvestres, na interface entre bovinos e ungulados silvestres e entre os animais e o ambiente permanecem desconhecidos. Não há evidência a uma escala fina das cadeias de transmissão, relacionando a infeção dos hospedeiros silvestres com a dos hospedeiros domésticos, que permita inequivocamente demonstrar o contexto spatiotemporal e ecológico da transmissão cruzada. O conhecimento mecanístico desta dinâmica é essencial para apoiar políticas sanitárias e gerir populações.

O material biológico acumulado, aliado a tecnologias de última geração (WGS- sequenciação completa do genoma), coloca o INIAV numa posição ímpar para desvendar, com uma resolução sem precedentes, os padrões de transmissão em diferentes cenários epidemiológicos. Neste âmbito, iniciou-se recentemente o Projeto COLOSSUS- *ControlO de tubercuLOSe na interface bovinoS-faUna Silvestre com recurso a soluções inovadoras inspiradas na natureza* (POCI-01-0145- FEDER-029783), liderado pelo INIAV em colaboração com a FCUL (BioISI) (PT), CIBIO (PT) e Universidade da Georgia (EUA), que tem como objetivos reconstruir a história demográfica de *M. bovis*, inferir as cadeias de transmissão em ungulados domésticos e selvagens, hierarquizar o risco de infeção e identificar espécie(s) e área(s) de intervenção prioritária, reunindo informação relevante que dê suporte à decisão de autoridades oficiais, proprietários e entidades gestoras. A sequenciação completa dos genomas de centenas de isolados de *M. bovis* obtidos de diferentes contextos epidemiológicos está em curso.

Figura 1. À esquerda- árvore filogenética de *M. bovis* isolados em Portugal (a vermelho) e outras regiões do mundo (a preto), com recurso a Maximum Likelihood, assente na análise de SNPs determinados por WGS; ao centro, em cima- imagens de citometria de fluxo de *M. bovis* BCG Tokyo para discriminação de células vivas e células permeabilizadas; à direita, em cima- rede de regulação do gene *fadD29*. Em baixo, esquerda- reconstrução de árvore de transmissão de *M. bovis* isolados de veados (azul), javalis (verde) e bovinos (vermelho), baseada na análise de SNPs obtidos por WGS e de metadados; em baixo, centro- Minimal Spanning Tree de *M. bovis* isolados em Portugal, com base em MIRU-VNTR; em baixo, direita- heatmap representando a expressão diferencial de genes selecionados (baseado em dados de RNAseq).



Futuro

A estratégia futura do INIAV para a investigação em fauna silvestre, espécies cinegéticas e, também, em tuberculose, passa, sobretudo, por transferir conhecimento e adequar as linhas de investigação às necessidades concretas do terreno. Isto passa por produzir e adequar dados científicos que suportem diferentes intervenções ajustadas a distintos cenários epidemiológicos. Desenvolveremos ferramentas quantitativas que permitam ajustar os recursos ao risco, nomeadamente uma aplicação computacional assente em modelos de transmissão multi-escala, capaz de prever a eficácia de diferentes intervenções (por ex. remoção seletiva de animais, medidas de biossegurança, vacinação, alteração de manejo, etc). Estes modelos serão baseados em simulações de surtos em bovinos, surtos em populações silvestres, e surtos nas diferentes interfaces, com incorporação de metadados e filodinâmica. A análise comparativa de genomas que temos em curso também permitirá elucidar aspetos da variação antigénica de *M. bovis*, o que tem implicações no diagnóstico laboratorial e no desenvolvimento de uma estratégia eficaz que proteja os animais da infeção. Por fim, estudos recentes sugerem que a contaminação e resiliência ambientais de *M. bovis* possam ter um papel importante na transmissão indireta, no entanto a ausência de técnicas sensíveis e escaláveis tem impedido o isolamento de *M. bovis* de matrizes ambientais, bem como a captura da sua assinatura molecular. Iremos no âmbito do projeto COLOSSUS, desenvolver uma nova abordagem baseada em citometria de fluxo, FISH, e WGS, que permita caracterizar *M. bovis* ambiental. A visão mecanística desta componente indireta da infeção será valiosa para entender o seu peso na manutenção de *M. bovis* no ecossistema e para decidir sobre as melhores opções de controlo.

Membros do grupo

Mónica V. Cunha, Coordenadora da Área de Fauna Silvestre, Caça e Biodiversidade | Investigadora Responsável dos Projetos MyPATH & COLOSSUS.

Ana Botelho, Responsável do Laboratório de Bacteriologia e Micologia e do LNR da Tuberculose Bovina / Investigadora do Laboratório Nacional de Referência de Saúde Animal / Investigadora Co-Responsável do Projecto COLOSSUS.

Teresa Albuquerque, Responsável do Diagnóstico Bacteriológico / Investigadora do Laboratório Nacional de Referência de Saúde Animal Ana C. Reis, Estudante de Doutoramento da Área de Fauna Silvestre, Caça e Biodiversidade.

Sandra Cavaco, LNR da Tuberculose Bovina.

André Pereira, Estudante de Doutoramento da Área de Fauna Silvestre, Caça e Biodiversidade.

Beatriz Ramos, Estudante de Doutoramento da Área de Fauna Silvestre, Caça e Biodiversidade. ■

Resumo

Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB.

| Campo | Resultado | Aplicación | Referencia |
|---------------|--|---|---|
| Diagnóstico | Optimização do diagnóstico molecular | Diagnóstico direto em tecidos | (Costa <i>et al.</i> , 2013) |
| | Diagnósticos alternativos | Utilização em laboratorios com menos recursos e aplicação pen-side | (Costa <i>et al.</i> , 2010, 2014) |
| Epidemiología | Conceito “Uma só Saúde” | Alerta da tuberculose como zoonose | (Amado <i>et al.</i> , 2006; Botelho <i>et al.</i> , 2014) |
| | Caracterização da estrutura populacional de <i>M. Bovis</i> em Portugal, distribuição espacio-temporal em explorações bovinas; identificação de fontes de infecção e vias de transmissão | Contributo para optimização das estratégias de controlo da tuberculose bovina, fontes de infecção e vias de transmissão | (Duarte <i>et al.</i> , 2010; Matos <i>et al.</i> , 2010b, 2010a) |
| | Caracterização da distribuição espacio-temporal da tuberculose em ungulados selvagens | Identificação das zonas de risco para explorações bovinas | (Vieira-Pinto <i>et al.</i> , 2011) |
| | Identificação do padrão de distribuição de <i>M. Bovis</i> em cenário de diferentes hospedeiros | Actualização de medidas de controlo em explorações e em zonas de caça (ZC) | (Cunha <i>et al.</i> , 2011, 2012) |

Objetivos inmediatos y su beneficio potencial para el control de TB.

| Campo | Objetivo | Beneficio |
|-------------------------------|---|--|
| Diagnóstico | Desenvolver novo método de isolamento e caracterização de <i>M. Bovis</i> ambiental | Incorporar e quantificar a contribuição de múltiplas fontes ambientais na transmissão indireta de <i>M. Bovis</i> |
| Epidemiología | Inferir as cadeias de transmissão a múltiplas escalas com base em filodinâmica, metadados e modelos matemáticos | Incorporar e quantificar a contribuição de múltiplas fontes na dinâmica de transmissão de <i>M. Bovis</i> |
| Transferência de Conhecimento | Desenvolver aplicação computacional assente em modelos eco-epidemiológicos | Definir melhor opção de controlo de TB em ZC e explorações com base em métodos quantitativos e relação custo-benefício |
| Diagnóstico | Desenvolver novo método de isolamento e caracterização de <i>M. Bovis</i> ambiental | Incorporar e quantificar a contribuição de múltiplas fontes ambientais na transmissão indireta de <i>M. Bovis</i> |
| Epidemiología | Inferir as cadeias de transmissão a múltiplas escalas com base em filodinâmica, metadados e modelos matemáticos | Incorporar e quantificar a contribuição de múltiplas fontes na dinâmica de transmissão de <i>M. Bovis</i> |
| Transferência de Conhecimento | Desenvolver aplicação computacional assente em modelos eco-epidemiológicos | Definir melhor opção de controlo de TB em ZC e explorações com base em métodos quantitativos e relação custo-benefício |

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

José Antonio Infantes Lorenzo

ja.infantes@ucm.es

www.ucm.es

Historia

La Unidad de Inmunología Microbiana del Instituto de Salud Carlos III está certificada por AENOR según Norma UNE-ISO 9001 para la producción y caracterización de anticuerpos monoclonales (AcMo). El personal es uno de los equipos expertos nacionales en la producción de AcMo y tiene amplia experiencia en el campo de la proteómica, la identificación de inmunoproteínas, así como en el estudio de la respuesta inmune frente a patógenos microbianos. En el año 2013 comienza, mediante colaboración con el centro VISAVET-UCM y la empresa CZ Veterinaria un proyecto para la caracterización de las PPD bovina y aviar y, el desarrollo de pruebas serológicas para la detección de animales infectados, introduciéndose de esta forma en el estudio de la tuberculosis animal. Posteriormente continúa con diversos proyectos relacionados con el diagnóstico serológico de la tuberculosis en distintas especies animales domésticas y silvestres en colaboración con el IREC, Universidad de Córdoba, Neiker y SERIDA-ULE como centros nacionales y APHA y Surrey University/PHE como centros extranjeros.

Actualidad

Hemos llevado a cabo una caracterización inmunoproteómica utilizando cuatro AcMo frente al derivado proteico purificado de *M. bovis* (PPDb) lo que nos han permitido identificar cinco proteínas inmunodominantes: MPB70, MPB83, HspX y ESAT-6, exclusivas del complejo *M. tuberculosis* (MTBC), y meromycolate acyl carrier protein presente también en la PPDa (derivado proteico purificado de *M. avium* subsp. *avium*). Las cuatro primeras forman parte de un complejo multiproteico, que se obtiene siempre por inmunopurificación, a partir de la PPDb, con el AcMo SIM 377-18 el cual reconoce un epítipo común en las proteínas MPB70 y MPB83. A este complejo multiproteico lo denominamos P22 porque en el análisis por western-blot muestra una proteína mayoritaria con movilidad electroforética a la altura aproximada de 22 kDa.

Paralelamente hemos realizado un análisis mediante espectrometría de masas de las PPDb y PPDa por ser los reactivos utilizados en el diagnóstico de tuberculosis, y de nuestro nuevo producto P22. Este estudio nos permitió identificar las proteínas constituyentes de las tres preparaciones, así como las proteínas compartidas entre ellas; y proponer P22 para ser utilizado en ensayos tipo ELISA en la detención de anticuerpos específicos frente a bacterias del MTBC.

Por último, hemos descrito el desarrollo y la validación de un ELISA indirecto basado en el complejo proteico P22, para utilizar en el diagnóstico de tuberculosis en distintas especies domésticas (ganado bovino, caprino, ovino, porcino, llamas y alpacas) y silvestres (ciervos, jabalíes y tejones), obteniendo una sensibilidad de entre un 63% y un 100% y una especificidad de entre un 75% y un 100%, dependiendo de la especie. Debido a su excelente especificidad en cerdos y camélidos y una especificidad aceptable en ganado bovino, ovejas y tejones, este ELISA puede constituir una buena opción para el diagnóstico de la tuberculosis a nivel de rebaño. Además, se propone el diagnóstico serológico como técnica de vigilancia para detectar anticuerpos específicos frente MTBC, sobre todo en países oficialmente libres de tuberculosis y en animales no sometidos a la prueba de la IDTB debido a su alta especificidad en estas condiciones y sus ventajas (simplicidad, bajo costo y requisitos de recursos mínimos).

Los diferentes estudios se han llevado a cabo con la colaboración de centros como VISAVET-UCM, Sa-Bio-IREC, CZ Veterinaria, Universidad de Córdoba, NEIKER, SERIDA, Universidad de León, APHA (Reino Unido) y Universidad de Surrey/PHE (Reino Unido).

Futuro

Los estudios llevados a cabo en la unidad de Inmunología Microbiana han estado relacionados fundamentalmente con la caracterización de antígenos implicados en la respuesta inmune mediada por anticuerpos y con la propuesta de dichos antígenos como candidatos a ser utilizados en el diagnóstico de tuberculosis en distintas especies. En un futuro cercano tenemos como prioridad evaluar la eficacia de estos reactivos en muestras de primates superiores, así como terminar la caracterización mediante ensayos inmunoproteómicos de proteínas comunes entre *M. bovis*, *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* y *Corynebacterium pseudotuberculosis*, para así obtener reactivos que permitan reducir esta reactividad cruzada en pruebas diagnósticas. Igualmente, y en colaboración con los grupos mencionados llevaremos a cabo estudios de inmuoestimulación/protección con los antígenos identificados en micobacterias.

Objetivos concretos

1. Caracterización inmunoproteómica de *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* y *C. pseudotuberculosis*. Para abordar los problemas relacionados con la especificidad de las técnicas de diagnóstico, estudiaremos las proteínas compartidas entre *M. bovis*, *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* y *C. pseudotuberculosis*, mediante la utilización de AcMo obtenidos con las bacterias mencionadas o productos provenientes de ellas.
2. Evaluación de un ELISA indirecto para el diagnóstico de tuberculosis en muestras de leche. En el ganado de aptitud láctea, la leche constituye una muestra fácil de obtener, rápida y no invasiva en comparación al suero. Además, el análisis de muestras de tanques de leche puede suponer una técnica útil para el cribado de animales a analizar, reduciendo así el número de animales analizados. Para ello es necesario estudiar la correlación entre el título de anticuerpos del suero y la leche a nivel individual, así como la posibilidad de utilizar muestras de tanque de leche para el diagnóstico.
3. Estudios de Inmunomodulación-Protección. Los productos derivados de *M. bovis*, *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis* y *C. pseudotuberculosis*, una vez caracterizados inmunoproteómicamente, al ser más simples, más fáciles de estandarizar y de composición definida, pueden constituir el punto de partida para estudios que permitan esclarecer los mecanismos moleculares implicados en el proceso de inmunomodulación y de “inmunidad entrenada”. ■

Resumen

Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB.

| Campo | Resultado | Aplicación | Referencia |
|---------------|---|---|--|
| Diagnóstico | Caracterización proteómica de PPD _b , PPD _a y P22 | Proposición de P22 como alternativa a la PPD _b para el diagnóstico serológico de tuberculosis animal | (Infantes-Lorenzo <i>et al.</i> , 2017) |
| Diagnóstico | Nuevas técnicas serológicas para la detección de anticuerpos específicos en múltiples especies | Prueba de elección para vigilancia epidemiológica en suídos y en carnívoros Prueba de screening para rumiantes | (Infantes-Lorenzo <i>et al.</i> , 2018, 2019a, 2019b, Thomas <i>et al.</i> , 2019a, 2019b) |
| Diagnóstico | Combinación de técnicas basadas en respuesta inmune celular y serología para maximizar la detección de animales infectados | Mejora en el diagnóstico de tuberculosis bovina y caprina | (Casal <i>et al.</i> , 2017; Bezos <i>et al.</i> , 2018) |
| Diagnóstico | Optimización del IFN- γ en ciervos | Diagnóstico de tuberculosis en cérvidos | (Risalde <i>et al.</i> , 2017) |
| Epidemiología | Identificación de factores de riesgo que determinan la prevalencia de TB en jabalíes | Gestión de residuos de caza para controlar la TB en jabalíes | (Cano-Terriza <i>et al.</i> , 2018a) |
| Epidemiología | Determinación de la seroprevalencia, los factores de riesgo, la distribución espacial y los espilogotipos de MTBC que circulan en cerdos criados en extensivo | Implementar medidas de vigilancia y control basados en el riesgo en este tipo de granjas | (Cano-Terriza <i>et al.</i> , 2018b) |

Objetivos inmediatos y su beneficio potencial para el control de TB.

| Campo | Objetivo | Beneficio |
|-------------|--|---|
| Diagnóstico | Diseño y evaluación de un ELISA para el diagnóstico serológico tuberculosis en ovino | Mejora en la vigilancia y diagnóstico de la tuberculosis en el ganado ovino |
| Diagnóstico | Diseño y evaluación de un ELISA para el diagnóstico de TB en leche | Mejora en la vigilancia y diagnóstico de la tuberculosis en ganado caprino lechero |
| Diagnóstico | Caracterización inmunoproteómica de la PPD _b | Estudio de las proteínas implicadas en la respuesta inmune humoral |
| Diagnóstico | Caracterización inmunoproteómica de <i>M. avium</i> subsp. <i>avium</i> , <i>M. avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i> y <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> | Determinación de las proteínas implicadas en los fenómenos de reactividad cruzada en el diagnóstico de tuberculosis |

Grupo de Epidemiología del Departament de Sanitat i Anatomia Animals (Facultat de Veterinària, UAB) y del Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA-IRTA). Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB)

Alberto Allepuz

alberto.allepuz@uab.cat

www.uab.cat

Historia

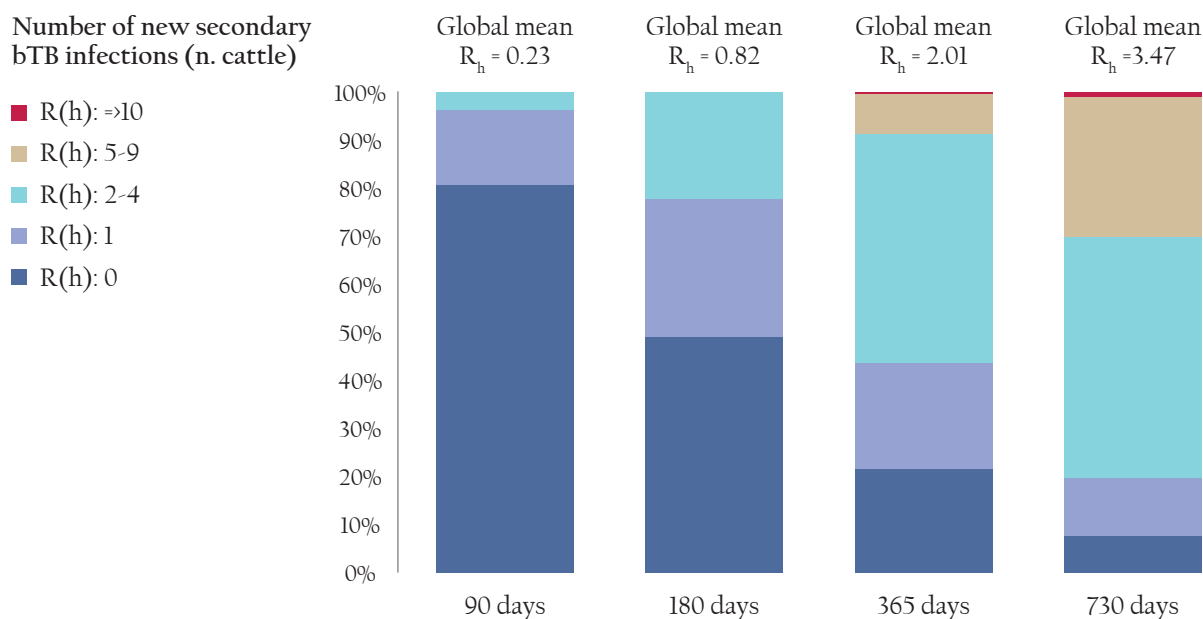
El grupo de epidemiología de la UAB-CReSA-IRTA viene trabajando desde casi una década en distintos aspectos relacionados con la Epidemiología y el control de la tuberculosis en el ganado vacuno. Además, en colaboración con otros grupos de trabajo, nuestro grupo ha participado en investigaciones sobre el papel epidemiológico de otros posibles reservorios domésticos y silvestres. Ofrecemos soporte a la docencia y la investigación de la Epidemiología de la tuberculosis basando nuestra actividad también en proyectos y contratos y/o convenios con otras instituciones públicas. En particular, en los últimos años se han llevado a cabo dos proyectos de investigación financiados por el MINECO y han sido firmados dos contratos con el Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, así como asesorías puntuales con el Departament d'Agricultura de la Generalitat de Catalunya con relación al programa de vigilancia de dicha enfermedad. Además de ello, uno de nosotros forma parte de un grupo de trabajo del ANSES sobre el uso del interferón gamma en el diagnóstico de la tuberculosis y todos los miembros del grupo participan en los "Cursos de realización de Encuestas Epidemiológicas in situ para especialista/coordinadores de las comarcas" y los "Cursos de Formación en los aspectos teóricos, prácticos y de base legal en el diagnóstico de tuberculosis bovina". Todos estos proyectos y contratos han tenido como objetivo profundizar en el conocimiento de la epidemiología de la tuberculosis en bovino y en el estudio de la evolución del plan de erradicación de tuberculosis y su relación con diferentes variables.

Actualidad

En la actualidad el grupo tiene diferentes líneas de trabajo dirigidas principalmente a la comprensión de los factores relacionados con la dificultad de erradicar la enfermedad del territorio, teniendo en cuenta tanto los aspectos biológicos como los no-biológicos (sociológicos). En concreto, se están analizando las causas más probables por las que las granjas se están infectando a partir de los datos recogidos en las encuestas epidemiológicas, complementadas con datos de movimientos y de espoligotipos. También se están elaborando modelos de regresión logística, que a partir de la información recogida en las encuestas del sistema BRUTUB, nos permitirán profundizar el conocimiento de los posibles factores relacionados con el riesgo de tener brotes persistentes en diferentes puntos de España.

Además, se están desarrollando modelos matemáticos de simulación con el objetivo final de poder valorar diferentes estrategias de vigilancia. Utilizando los datos de la campaña de erradicación, el desarrollo de un primer modelo nos ha permitido estimar los parámetros de transmisión de la tuberculosis dentro de los rebaños bovinos (coeficiente medio de transmisión 5,2 nuevos animales infectados por animal infeccioso por año; duración media del período de latencia 97 días), y evidenciar una gran variabilidad entre los rebaños estudiados. Este mismo modelo nos permitió también calcular el número medio de casos secundarios causados por un solo animal infectado introducido en un rebaño (R_h); este parámetro ha sido computado considerando distintos intervalos de tiempo entre dos pruebas de rutina (Figura 1). Un segundo modelo de simulación nos permitió evaluar la eficacia de los tres componentes del sistema de vigilancia (vigilancia de rutina, vigilancia en mataderos y pruebas pre-movimientos) a nivel nacional y de provincias. Bajo las condiciones de vigilancia implementadas a nivel nacional, la vigilancia de rutina resulta ser el componente más efectivo, siendo capaz de detectar con una probabilidad del 94,3% las granjas bovinas infectadas dentro de un año de la infección; la eficacia de la vigilancia en matadero y las pruebas pre-movimientos ha resultado ser menor; sin embargo, estos componentes también contribuyen a la detección de rebaños infectados, sobretodo en algunas provincias.

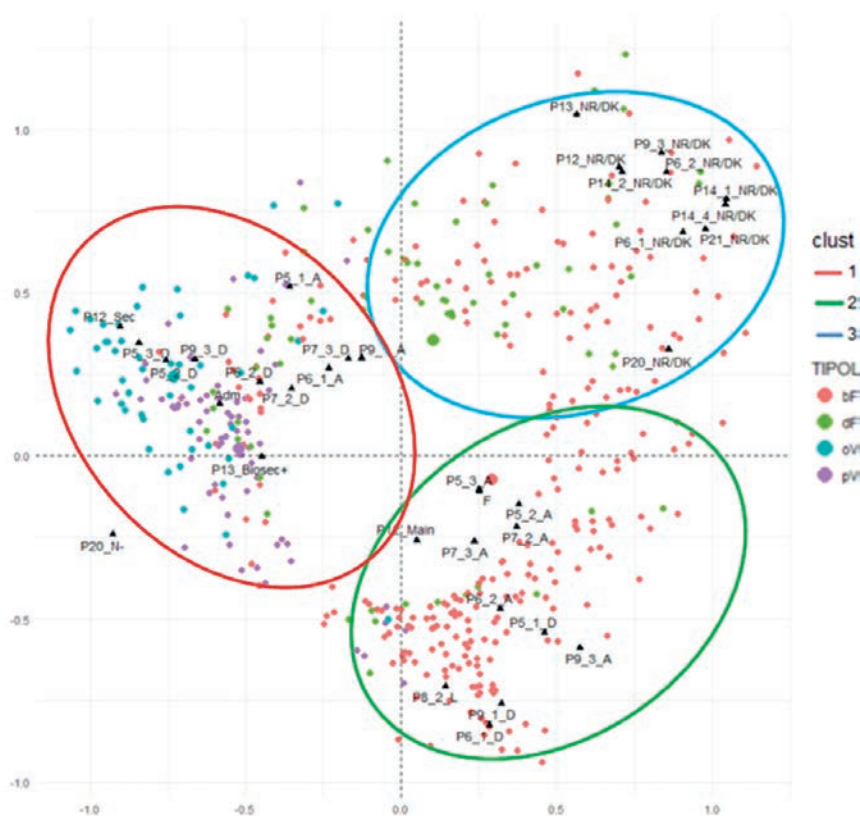
Figura 1. Gráfico de barras que resume el número medio de casos secundarios generado después de introducir un animal oculto en un rebaño totalmente susceptible (R_h), considerando un tiempo promedio para la propagación de la enfermedad de 90, 180, 365 y 730 días. Por cada tiempo de propagación se han ejecutado 22.000 simulaciones y en la parte superior de las barras se indican los valores promedio globales de R_h .



Paralelamente se están estudiando los factores no-biológicos que pueden obstaculizar la erradicación de la tuberculosis. En particular, a través de la colaboración multidisciplinar con sociólogos, se están investigando las diferentes opiniones circulantes sobre el programa de erradicación entre ganaderos y veterinarios de una CCAA de alta prevalencia y otra de baja prevalencia. En un primer estudio utilizamos enfoques cualitativos empleando entrevistas exploratorias y entrevistas en profundidad que nos permitió identificar los principales argumentos. Los resultados han evidenciado que el programa de erradicación de la tuberculosis, especialmente entre ganaderos, es percibido como una obligación impuesta por la ley y se ha manifestado

una inadecuada motivación a su aplicación. Faltas en el conocimiento de la enfermedad y carencias en la comunicación entre los actores principales, en combinación con la complejidad de la epidemiología de la tuberculosis han contribuido a generar una desconfianza hacia las medidas de control. También se mencionó una baja fiabilidad en la prueba cutánea, así como presiones a los veterinarios durante el saneamiento. En general, los ganaderos no perciben muchos beneficios en la erradicación de la enfermedad y, en algunos casos, han mencionado sentirse discriminados en comparación a la gestión y control de la enfermedad en otros tipos de producción (ej., granjas de lidia) y especies silvestres (ej., granjas cinegéticas). Con posterioridad, y utilizando como base del estudio la información adquirida con la metodología cualitativa, se ha llevado a cabo una encuesta telefónica entrevistando una muestra de 706 ganaderos y 180 veterinarios (493 personas de una CCAA de alta prevalencia y 393 de una de baja prevalencia). Estos datos cuantitativos nos han permitido conocer cuántas personas comparten los mismos argumentos e identificar los principales aspectos relacionados con las diferencias de opinión entre los entrevistados. Un análisis de correspondencia múltiple, seguido de un análisis de conglomerados, nos ha permitido demostrar la existencia de tres distintos perfiles de opinión. La percepción sobre el impacto de la tuberculosis, la confianza en los resultados de las pruebas de diagnóstico y las opiniones sobre la importancia de otros reservorios fueron las variables que han determinado la partición en los tres aglomerados (ej., perfiles de opinión), y cada categoría de estas variables caracterizó un grupo: hay personas con actitudes positivas hacia el programa de erradicación, otras con actitudes negativas y un tercer grupo ha mostrado una clara tendencia a no contestar. Los veterinarios han expresado en su mayoría una actitud positiva hacia el programa mientras que los ganaderos han mostrado una elevada heterogeneidad en sus opiniones y la presencia de actitudes opuestas (Figura 2). Actualmente, los datos sobre las opiniones de ganaderos y veterinarios se están terminando de analizar mediante un modelo de regresión para cuantificar las principales diferencias entre los grupos.

Figura 2. Mapa factorial de los clusters identificados. Cada cluster está indicado con un círculo de color diferente. Los puntos representan los individuos, representados con distintos colores según el grupo profesional de pertenencia: bF, ganaderos de carne; dF, ganaderos de leche; oV, veterinarios comarcales; pV, veterinarios de saneamiento.



Futuro

Las principales líneas que queremos desarrollar en el futuro como son:

1. Profundizar en cómo se están infectando las granjas a partir de la secuenciación completa del genoma y la incorporación de datos epidemiológicos.
2. Investigar estrategias de vigilancia alternativas adaptadas a la prevalencia de la zona.
3. Profundizar la influencia de los factores sociológicos en la campaña de erradicación, con el objetivo de identificar los motivadores claves para involucrar a los ganaderos y veterinarios en la campaña de erradicación de la tuberculosis.
4. Investigar las dinámicas y los procesos de comunicación existentes entre todos los actores del programa de erradicación.
5. Desarrollar apropiadas estrategias de comunicación y formación para mejorar el conocimiento sobre la enfermedad entre los ganaderos y aumentar la confianza en el programa de erradicación de la tuberculosis. ■

Resumen

Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB.

| Campo | Resultado | Aplicación | Referencia |
|-------------------------|--|--|--|
| Epidemiología | La sensibilidad de la detección post-mortem de la tuberculosis a nivel de matadero es baja (por debajo de 50%) | La vigilancia de la tuberculosis a nivel de matadero es esencial, pero debe ser complementada con otros métodos para la detección de casos de TB | (García-Saenz <i>et al.</i> , 2015) |
| Epidemiología | Identificación de los principales argumentos circulantes entre ganaderos y veterinarios sobre el programa de erradicación de la tuberculosis | Mejora del conocimiento de los aspectos sociales que podrían influenciar la aplicación del programa de erradicación | (Ciaravino <i>et al.</i> , 2017) |
| Epidemiología | Las diferentes actitudes hacia el programa de erradicación se caracterizan por las opiniones sobre la fiabilidad de las pruebas diagnósticas, el rol atribuido a los reservorios silvestres y la percepción del impacto de la tuberculosis | Intervenciones para mejorar la colaboración y aumentar la aceptabilidad de las medidas de control | Ciaravino <i>et al.</i> (en preparación) |
| Epidemiología / Control | Estimación de los parámetros de transmisión de la tuberculosis dentro de los rebaños bovinos y del número medio de casos secundarios generados por la introducción de un animal infectado en un rebaño susceptible (Rh) | Mejora de las estrategias tanto para la detección como para la eliminación de la tuberculosis en los rebaños bovinos infectados | (Ciaravino <i>et al.</i> , 2018) |
| Control | Las pruebas de rutina son el componente de vigilancia más eficaz en España; la vigilancia en mataderos y las pruebas previas a movimientos contribuyen a la detección de una pequeña proporción de rebaños infectados | Evaluación de las estrategias de vigilancia implementadas en la actualidad y de posibles estrategias alternativas | Ciaravino <i>et al.</i> (en preparación) |

Objetivos inmediatos y su beneficio potencial para el control de TB.

| Campo | Objetivo | Beneficio |
|------------------------------|--|---|
| Epidemiología | Profundizar en cómo se están infectando las granjas | Establecer medidas preventivas para reducir el riesgo de infecciones por tuberculosis |
| Control | Investigar estrategias de vigilancia alternativas | Maximizar la inversión de recursos y la eficacia de la vigilancia en función de prevalencia y riesgo de infección |
| Epidemiología | Identificar motivadores para mejorar el compromiso de ganaderos y veterinarios con el programa de erradicación | Mejora de la aplicación de los programas de control |
| Epidemiología / Comunicación | Investigar las dinámicas y los procesos de comunicación entre los actores del programa de erradicación | Identificación de debilidades y fortalezas y mejora de la comunicación |
| Comunicación | Desarrollar estrategias de comunicación y formación | Mejora de la confianza en el programa de erradicación y en los servicios veterinarios |

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

Bernat Pérez de Val

bernat.perez@irta.cat

www.cresa.cat

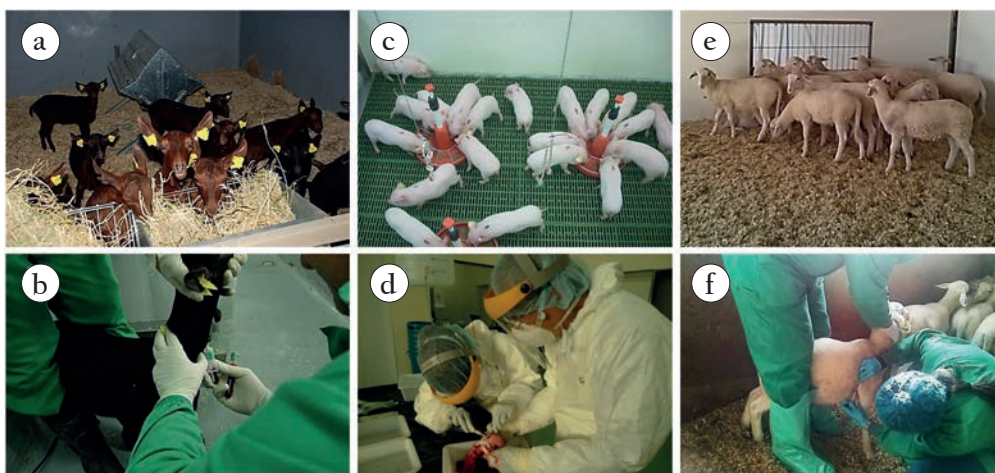
www.irta.cat

Historia

El CReSA se creó en 1999 con los objetivos de la investigación y el desarrollo tecnológico y los estudios y la enseñanza en el ámbito de la sanidad animal. Desde 2015 el CReSA es un centro propio del IRTA, instituto adscrito al Departamento de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (DARP) de la *Generalitat de Catalunya*. La investigación del IRTA-CReSA se enmarca dentro del Programa de Sanidad Animal.

Tras la creación de un marco de colaboración estable con el DARP en 2003, el CReSA participa en el Programa de erradicación de la tuberculosis bovina en Cataluña. En 2008, se incorpora la vigilancia en mataderos a través del servicio de apoyo a mataderos (SESC) por encargo del Departamento de Salud de la Generalitat de Catalunya. En 2012, la colaboración con el DARP se extiende al Plan de vigilancia sanitaria de la fauna silvestre en Cataluña y, desde 2014, a estudios piloto de control de la tuberculosis caprina. Los estudios fruto de esta colaboración del CReSA en los programas oficiales ha derivado en diversas publicaciones y comunicaciones científicas.

*Figura 1. Ejemplos de estudios con infección experimental de tuberculosis en modelos caprino (a, b), minipig (c, d) y ovino (e, f) para evaluar la eficacia de vacunas frente a la tuberculosis animal y/o humana. Las imágenes (a) y (e) corresponden a caprinos y ovinos en una granja experimental durante la fase previa al desafío con *M. caprae*, mientras que la imagen (c) corresponde a minipigs ya desafiados con *M. tuberculosis* en la Unidad de Biocontención de Nivel 3 del IRTA-CReSA. Las imágenes (b), (d) y (f) muestran extracción de sangre, necropsia y vacunación subcutánea en caprinos, minipigs y ovinos, respectivamente. (Fotos: IRTA-CReSA).*

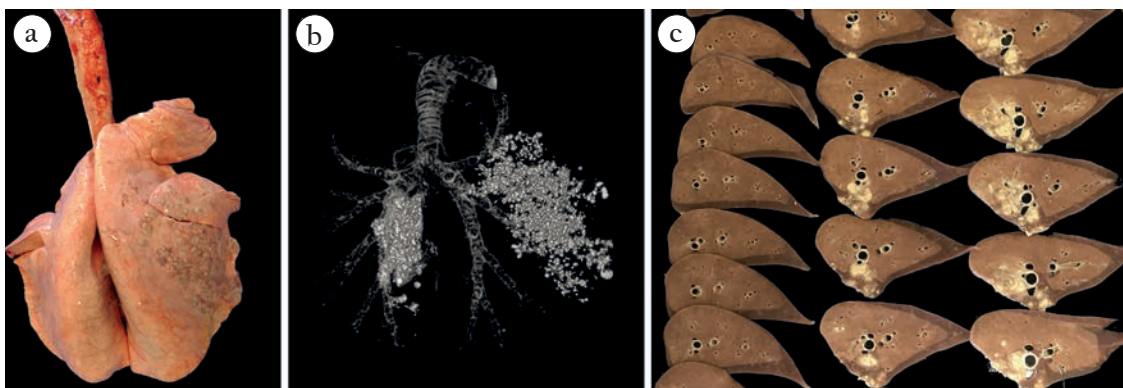


Desde 2004, el CReSA ha investigado ininterrumpidamente la seguridad, la inmunogenicidad y la eficacia de vacunas y el desarrollo y evaluación de herramientas de diagnóstico, así como nuevas aproximaciones para el control de la tuberculosis animal y humana. Para ello se ha trabajado con diferentes modelos experimentales (Figura 1) en la Unidad de Biocontención de Nivel 3 del IRTA-CReSA que forma parte de la Infraestructura Científica y Tecnológica Singular (ICTS) RLASB (www.rlasb.es).

Estos estudios se han llevado a cabo en el marco de proyectos nacionales e internacionales, o en contratos con empresas u otros institutos de investigación. Entre los hitos más recientes destacan:

- Desarrollo de modelos de infección experimental de complejo *M. tuberculosis* en cabras, ovejas (colaboración con SERIDA, Figura 2) y minipigs.
- Eficacia de diferentes candidatos a vacuna contra la tuberculosis caprina y ovina, así como la evaluación de nuevos reactivos de diagnóstico para diferenciar animales infectados y vacunados (DIVA).
- Interferencia de la vacunación frente a *paratuberculosis* en el diagnóstico de la tuberculosis caprina, evaluando también la protección cruzada.
- Estudio de la seguridad y eficacia de la vacuna *M. bovis* BCG en cabras en condiciones de campo.

Figura 2. TB pulmonar en un cordero infectado experimentalmente con *M. caprae*. (a) Pulmón en el que se observan múltiples granulomas sub-pleurales. (b) Imagen 3D de las lesiones tuberculosas del pulmón obtenida mediante Tomografía Axial Computarizada. (c) Secuencia de secciones de 5 mm de grosor del pulmón en el que se observan lesiones granulomatosas caseosas-necrotizantes. (Fotos: IRTA-CReSA).



Actualidad

En 2017 arrancó el proyecto del INIA RTA-2015-0043-C02-00 (cofinanciado por FEDER), sobre “Diagnóstico, vacunación y nuevas herramientas de lucha frente a la tuberculosis en la especie caprina” y co-participado por VISAVET-UCM. El IRTA-CReSA está llevando a cabo los siguientes estudios en el marco de este proyecto:

- Evaluación de la eficacia de *M. bovis* inactivado frente a la tuberculosis caprina.
- Estudio de la duración de la inmunidad de BCG en caprinos y de la eficacia de la revacunación.
- Estudios de eficacia de la vacuna BCG en ganado caprino en condiciones de campo a largo plazo.

También se está participando en diferentes estudios para evaluar la eficacia antituberculosa del suplemento alimentario Nyaditum resae® frente a la tuberculosis en colaboración con el *Institut de Recerca Germans Tries i Pujol* y la empresa Manremyc.

Se continúa trabajando en los encargos del DARP, con especial hincapié en los estudios de brote en la interfaz doméstico-silvestre, en pequeños rumiantes y reforzando la red de muestreo para la vigilancia de fauna silvestre.

Futuro

El objetivo general del grupo es investigar estrategias integrales de control de la tuberculosis en sistemas multi-hospedador, incluyendo animales domésticos y silvestres:

1. **Ganado bovino.** El principal reto que queremos abordar es la mejora de la especificidad del diagnóstico, ya sea con el desarrollo y evaluación de reactivos más específicos que las tuberculinas, como con el estudio de nuevas estrategias de saneamiento en zonas de baja prevalencia y bajo riesgo de tuberculosis.
2. **Pequeños rumiantes.** En relación al ganado caprino, nuestra aproximación es la de disminuir la transmisión de la infección entre animales, ya sea por tratamientos preventivos o post-exposicionales, evitando la progresión de la infección una vez ésta se establece. En el ganado ovino, nuestro objetivo es profundizar en el cocimiento de su papel epidemiológico y evaluar medidas de diagnóstico y control de la tuberculosis en esta especie.
3. **Fauna silvestre.** Se realizarán estudios de seguimiento de los brotes de tuberculosis en jabalí en diferentes áreas de Cataluña, con especial hincapié en el Pirineo y en las áreas con interacciones entre jabalíes y pequeños rumiantes. También se pretende estudiar el papel de los topillos en la Epidemiología y transmisión de la tuberculosis, fundamentalmente de *M. microti*. Finalmente, se pretende trabajar cooperativamente con otros grupos, en el desarrollo de un modelo de infección experimental de tuberculosis en hurones, como modelo para el desarrollo de herramientas para el control de la tuberculosis en tejones. ■

Resumen

Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB.

| Campo | Resultado | Aplicación | Referencia |
|-------------|--|--|---|
| Control | Seguridad y eficacia de BCG y <i>M. bovis</i> inactivado en cabras y ovejas | Evaluación de vacunas y estrategias de vacunación en condiciones de campo | (Pérez de Val <i>et al.</i> , 2016; Balseiro <i>et al.</i> , 2017; Vidal <i>et al.</i> , 2017; Arrieta-Villegas <i>et al.</i> , 2018) |
| Control | Estudio de brotes con interacciones multi-especie y seguimiento de las acciones de control | Intervenciones para el control integral de la TB en sistemas multi-hospedador | (Pérez de Val <i>et al.</i> , 2018a; Vidal <i>et al.</i> , 2018a, 2018b) |
| Diagnóstico | Algunos reactivos de diagnóstico DIVA permiten diferenciar animales vacunados e infectados | Mejora del diagnóstico de TB basado en tuberculinas | (Pérez de Val <i>et al.</i> , 2016; Arrieta-Villegas <i>et al.</i> , 2018) |
| Diagnóstico | Desarrollo de ELISA de anticuerpos multi-especie y evaluación en la vigilancia de la TB en fauna silvestre | Diagnóstico de TB en fauna silvestre y uso en programas de vigilancia y control integral | (Pérez de Val <i>et al.</i> , 2017, 2018b) |

Objetivos inmediatos y su beneficio potencial para el control de TB.

| Campo | Objetivo | Beneficio |
|-----------------------|--|--|
| Control | Evaluación de eficacia y durabilidad de la inmunidad de vacunas, inmunoestimuladores y suplementos alimentarios en condiciones campo | Nuevas herramientas para el control de la TB animal |
| Control | Desarrollo de modelos experimentales (hurones) | Desarrollo de herramientas para el control de la TB en tejones |
| Diagnóstico | Evaluación de nuevos reactivos de diagnóstico (especificidad y DIVA) | Mejora del diagnóstico de la TB y de los programas de control |
| Control/Epidemiología | Estudios de campo y en condiciones experimentales de patogenicidad y transmisión de TB en especies silvestres (topillos y cabra salvaje ibérica) | Control integral de la TB en sistemas multi-hospedador y mejor conocimiento de la transmisión, patogenia y epidemiología de la TB animal |
| Control | Evaluación de eficacia y durabilidad de la inmunidad de vacunas, inmunoestimuladores y suplementos alimentarios en condiciones campo | Nuevas herramientas para el control de la TB animal |

Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (NEIKER)

Joseba Garrido

jgarrido@neiker.eus

www.neiker.net

Historia

NEIKER, Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, es una empresa pública dependiente del Departamento de Desarrollo Económico e Infraestructuras 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 doméstico como a la fauna silvestre. Tanto la *paratuberculosis* como la tuberculosis han sido dos enfermedades a las que históricamente se les ha dedicado especial atención y esfuerzo en NEIKER. El trabajo llevado a cabo en ellas se ha desarrollado en estrecha colaboración con las Diputaciones Forales y el Gobierno Vasco, así como con otros Centros de Investigación. Son ya más de 20 los proyectos de investigación financiados por el Plan Nacional y por la Unión Europea que se han ejecutado con nuestros socios habituales, como son SaBio-IREC, VISAVET, IRTA-CReSA, SERIDA y APHA (Reino Unido) en el caso de la tuberculosis, y la ULE, SERIDA y UPV/EHU en el caso de la *paratuberculosis* en los últimos 25 años.

Actualidad

Trabajo en el campo de la tuberculosis

1. Confirmación mediante técnicas microbiológicas e histopatológicas de los casos sospechosos de tuberculosis detectados en las Campañas de Erradicación en la CAPV o directamente en los mataderos de la CAPV. Se caracterizan los aislamientos para estudios epidemiológicos y se da soporte técnico a la administración local.
2. Uso de modelos de tuberculosis en jabalí, ciervo, tejón y ternero desarrollados en las instalaciones BSL3 de NEIKER.
3. Preparación y utilización de un inmunoestimulante desarrollado a partir de una cepa de *Mycobacterium bovis* inactivada por calor que se ha evaluado en los diferentes modelos en comparación con la BCG y en el caso de los terneros también con vacuna de *paratuberculosis*.

4. Realización de estudios de interferencia diagnóstica en cobaya mediante intradermorreacción.
5. Monitorización de la tuberculosis y otras micobacteriosis en la fauna silvestre de la CAPV.
6. Estudio de la interacción entre la fauna silvestre y las explotaciones de bovino intensivo y de su importancia en la epidemiología de la tuberculosis.

Trabajos en el campo de la *paratuberculosis* relacionados con la tuberculosis:

1. Ensayo experimental de campo para el control de la *paratuberculosis* bovina en ejecución desde 2005. Se dispone de explotaciones vacunadas y otras sometidas a saneamiento en base a pruebas serológicas y microbiológicas en las que se analiza tanto el efecto sobre el control de la *paratuberculosis* como la interferencia de la infección natural y de la vacunación con el diagnóstico de la tuberculosis.
2. Búsqueda de nuevos prototipos vacunales que confieran protección y que no interfieran con el diagnóstico oficial de la tuberculosis bovina.
3. Utilización de un modelo leporino desarrollado en NEIKER que permite realizar un cribado de los prototipos antes de su aplicación en la especie de destino.

Futuro

Nuestros principales objetivos de cara al futuro son:

1. El estudio de los casos reaccionantes al diagnóstico “*in vivo*” de la tuberculosis que no son confirmados mediante análisis histopatológicos y/o microbiológicos. Queremos profundizar en el conocimiento del efecto sobre el diagnóstico de rutina de la tuberculosis de:
 - La infección natural por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.
 - La vacunación frente a *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.
 - Otras micobacterias presentes en la explotación vehiculizadas de diferentes formas.
2. El desarrollo de nuevos productos vacunales, pautas y/o reactivos de diagnóstico que hagan factible la vacunación frente a tuberculosis en animales sometidos a campañas de erradicación.
3. El estudio de la interacción entre fauna silvestre y especies domésticas en el entorno de explotaciones bovinas. ■

Resumen

Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB.

| Campo | Resultado | Aplicación | Referencia |
|-----------------------|--|--|---|
| Diagnóstico | PCRs multiplex y otras técnicas moleculares | Detección de género <i>Mycobacterium</i> , <i>M. avium</i> y Complejo <i>M. tuberculosis</i> (CMTB) a partir de cultivos, muestras clínicas o productos ganaderos en una sola PCR o en formato individualizado. Transferido a VACUNEK. Identificación de especies de CMTB y subespecies de <i>M. avium</i> a partir de las mismas muestras (sin referenciar aún) | (Sevilla <i>et al.</i> , 2015, 2017) |
| Diagnóstico | Distribución de las lesiones en función de la vía de infección | Modificación del “Procedimiento de toma y envío de muestras para el cultivo microbiológico y diagnóstico de TB” | (Serrano <i>et al.</i> , 2018) |
| Diagnóstico / Control | Modelos de tuberculosis en jabalí, ciervo, tejón y ternero | Posibilidad de evaluar diferentes inmunógenos | (Garrido <i>et al.</i> , 2011; Serrano <i>et al.</i> , 2017a, 2017b; Thomas <i>et al.</i> , 2017) |
| Control | Desarrollo de un antígeno vacunal inactivado por calor | En función de las autorizaciones | (Garrido <i>et al.</i> , 2011) |
| Control | La vacuna frente a <i>Map</i> puede modificar el curso de las lesiones frente a TB | Posible candidato vacunal | (Serrano <i>et al.</i> , 2017a) |
| Control | Evaluación de la seguridad y la eficacia de productos inmunoestimulantes en tejones desafiados con <i>M. bovis</i> | Control de la infección en uno de los principales reservorios en Europa | (Balseiro <i>et al.</i> , 2018) |

Objetivos inmediatos y su beneficio potencial para el control de TB.

| Campo | Objetivo | Beneficio |
|-----------------------|--|--|
| Control | Evaluación de eficacia y durabilidad de la inmunidad de vacunas, inmunoestimuladores y suplementos alimentarios en condiciones campo | Nuevas herramientas para el control de la TB animal |
| Control | Desarrollo de modelos experimentales (hurones) | Desarrollo de herramientas para el control de la TB en tejones |
| Diagnóstico | Evaluación de nuevos reactivos de diagnóstico (especificidad y DIVA) | Mejora del diagnóstico de la TB y de los programas de control |
| Control/Epidemiología | Estudios de campo y en condiciones experimentales de patogenicidad y transmisión de TB en especies silvestres (topillos y cabra salvaje ibérica) | Control integral de la TB en sistemas multi-hospedador y mejor conocimiento de la transmisión, patogenicidad y epidemiología de la TB animal |
| Control | Evaluación de eficacia y durabilidad de la inmunidad de vacunas, inmunoestimuladores y suplementos alimentarios en condiciones campo | Nuevas herramientas para el control de la TB animal |

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

InBIO – Rede de Investigação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva

Nuno Santos

nuno.santos@cibio.up.pt

<https://cibio.up.pt/>

Historia

O InBIO, Laboratório Associado criado em 2011, envolve uma parceria entre o CIBIO - Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos, e o CEABN - Centro de Ecologia Aplicada de Baeta Neves. A investigação no CIBIO-InBIO tem por objetivo produzir conhecimento sobre a biodiversidade e aplicar esse conhecimento para enfrentar os desafios sociais relacionados com as mudanças no clima e no uso da terra, degradação ambiental, perda e uso sustentável da biodiversidade e restauração e uso sustentável dos ecossistemas. O CIBIO-InBIO abrange mais de 400 investigadores e estudantes, incluindo 180 doutorados, de cerca de 20 países. Os investigadores têm acesso a instalações laboratoriais e equipamentos de campo, incluindo modernos laboratórios genéticos e genómicos, e estão organizados em 34 grupos de investigação, incluídos em 3 linhas temáticas: Evolução, Genética e Genómica; Biodiversidade, Ecologia e Conservação; Sustentabilidade, Ecossistemas e Ambiente.

O núcleo de trabalho em tuberculose animal do CIBIO é recente e tem por base os doutoramentos de Nuno Santos (<https://cibio.up.pt/people/details/santosn>) e de João Queirós (<https://cibio.up.pt/people/details/jl-queiros>). Os principais temas de investigação de Nuno Santos são a Epidemiologia de doenças infecciosas e parasitárias em populações de animais selvagens, com particular interesse nos sistemas complexos, incluindo a ecologia de doenças em sistemas multi-hospedeiro-multi-agente patogénico, particularmente na interface animais domésticos-selvagens, co-infecções e doenças importantes para a conservação. Os principais temas de investigação de João Queirós são a genética/genómica de populações e a sanidade das populações selvagens. A sua tese de doutoramento combina informação destes dois campos para criar conhecimento sobre a interação entre hospedeiro-agente patogénico, estudando as características genéticas/genómicas populacionais dos hospedeiros que modulam as infeções por agentes patogénicos, bem como sua interação. Os modelos de estudo são dois hospedeiros naturais de tuberculose na Península Ibérica, o javali e o veado.

Atualidade

O volume de informação sobre TB em fauna selvagem na Península Ibérica tem crescido muito nas últimas décadas, mas subsistem lacunas importantes para compreender a sua Epidemiologia. Consequentemente, temos focado a nossa investigação na(o):

- Caracterização do reservatório ambiental de micobactérias do complexo *Micobacterium tuberculosis* (MTC), essencial para a transmissão inter-específica de TB.

- Investigação sobre as vias de excreção de *M. bovis/caprae* em infeções naturais, que permitiram identificar uma classe de ‘super-excretoras’ em javali e veado.
- Análise espacial de TB em fauna em Portugal, que permitiu identificar agregados geográficos, factores de risco e produzir mapas preditivos do risco de TB em fauna.
- Quantificação do reservatório animal de TB na Península Ibérica.
- Estudo da diversidade genética/genómica populacional dos hospedeiros veado e javali e o seu possível impacto na dinâmica temporal e espacial de TB.
- Caracterização de possíveis genes associados à suscetibilidade/resistência das populações/indivíduos à infeção por micobactérias MTC.
- Estudo do impacto das co-infeções na modulação da infeção por MTC.
- Desenvolvimento de metodologias não-invasivas para a monitorização demográfica das populações, especialmente de espécies elusivas como o javali.

Futuro

Partindo do conhecimento adquirido na análise epidemiológica de TB em fauna silvestre, propomo-nos estudar vários temas que consideramos relevantes:

- Zonificação da prevalência de TB em fauna silvestre.
- Criação de mapas de risco de TB em fauna silvestre.
- Compreender quais os fatores de risco (contexto) que parecem determinar o javali e veado como principais reservatórios de TB em fauna silvestre.
- Aprofundar o impacto das diversas modalidades de caça na diversidade genética/genómica das populações a longo prazo, e estimar a sua relação com a prevalência e incidência de TB.
- Desenvolver metodologias de genética não-invasiva para monitorizar demograficamente populações elusivas (javalis), tendo em vista melhorar a sua gestão, bem como avaliar o potencial excretor e disseminador de MTC.
- Explorar o conhecimento sobre os genes candidatos associados à suscetibilidade/resistência das populações/indivíduos à infeção por MTC.

Para além da criação de conhecimento, estas propostas permitiriam informar os planos de gestão e controlo da TB em fauna selvagem na Península Ibérica. ■

Figura 1. Estrutura espacial da TB em javali. Esquerda: revisão bibliográfica das prevalências reportadas na literatura, por província (Espanha) ou distrito (Portugal) – (Santos et al., 2012); Centro: agregados geográficos de TB em javali identificados em Portugal; Direita: mapa de risco previsto de TB em fauna em Portugal (N. Santos et al., 2018).



Resumo

Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB.

| Campo | Resultado | Aplicación | Referencia |
|---------------|---|---|----------------------------------|
| Epidemiología | Primeira descrição da Epidemiologia da TB em javali em Portugal | Identificação de factores de risco | (Santos <i>et al.</i> , 2009) |
| Diagnóstico | Comparação de métodos de diagnóstico de TB em javali | Estimativa da sensibilidade e especificidade de vários testes de diagnóstico | (Santos <i>et al.</i> , 2010) |
| Diagnóstico | Impacto das reações não-específicas no diagnóstico de TB em veados-vermelhos usando o teste de reação da tuberculina | Caracterização de possíveis agente bacterianos que causam reações positivas no teste de reação á tuberculina em veados-vermelhos | (Queiros <i>et al.</i> , 2012) |
| Epidemiología | Revisão bibliográfica da Epidemiologia da TB em fauna selvagem na Península Ibérica | Identificação de factores de risco; Primeira abordagem à estrutura espacial de TB em javali na Península Ibérica | (Santos <i>et al.</i> , 2012) |
| Genética | Análise do impacto das práticas de gestão e da história demográfica nos níveis de diversidade genética das populações de veado, e sua relação com o fitness individual e populacional | Estimativa preliminar sobre o impacto dos níveis de diversidade genética populacional na prevalência de TB | (Queiros <i>et al.</i> , 2013) |
| Genética | Desenvolvimento de marcadores do ADN nuclear (microsatélites) específicos para o veado-vermelho | Estimativas de diversidade genética populacional e individual | (Queirós <i>et al.</i> , 2015) |
| Epidemiología | Rastreio molecular de micobactérias patogénicas em amostras ambientais | Caracterização preliminar do reservatório ambiental de micobactérias patogénicas em zonas de alta e baixa prevalência de TB | (Santos <i>et al.</i> , 2015b) |
| Epidemiología | Rastreio molecular de micobactérias patogénicas em vias de excreção em infecções naturais | Identificação das vias de excreção; Identificação de 'super-excretores' em javali e veado | (Santos <i>et al.</i> , 2015a) |
| Genética | Relação entre diversidade genética populacional e individual no veado-vermelho e a infeção/disseminação de TB | Identificação do impacto da consanguinidade populacional na capacidade de resistir á infeção por MTC | (Queirós <i>et al.</i> , 2016) |
| Epidemiología | Análise espacial de TB em javali em Portugal | Validação de 'dried blood spots' como método de recolha de amostras para sorologia em TB; Mapas de risco de TB em fauna em Portugal; Identificação de factores de risco | (N. Santos <i>et al.</i> , 2018) |
| Genómica | Caracterização genómica do javali e a sua relação com a infeção por MTC | Identificação de genes candidatos associados á suscetibilidade/resistência do javali á infeção por MTC | (Queirós <i>et al.</i> , 2018) |
| Epidemiología | Importância das co-infeções na dinâmica temporal de TB | Caracterização da comunidade de microrganismos presentes nos gânglios mandibulares de javalis infetados e não infetados por MTC | (Queirós <i>et al.</i> , 2019) |

Objetivos inmediatos y su beneficio potencial para el control de TB.

| Campo | Objetivo | Beneficio |
|---------------|---|--|
| Epidemiología | Análise espacial de TB em fauna selvagem na Península Ibérica, utilizando o javali com espécie indicadora | Gestão da TB a nível ibérico: zonificação da prevalência de TB em fauna na Península Ibérica; Identificação de factores de risco; Mapas de risco de TB em fauna na Península Ibérica |
| Monitorização | Estimativas de abundância de javalis usando a genética não-invasiva, bem como monitorização da excreção de MTC | Gestão sustentável e responsável das populações de javali; avaliação do potencial disseminador das populações |
| Genómica | Compreender o impacto da informação genómica individual e populacional do veado e javali na resposta à infeção por MTC | Melhorar a gestão do pool genético das populações e assim incrementar a eficiência natural das populações resistir à doença |
| Epidemiología | Compreender quais os factores de risco (contexto) que parecem determinar o javali (em Espanha) e veado (em Portugal) como principal reservatório de TB em fauna silvestre | Identificação de factores de risco associados a diferentes realidades e mitigação destes mesmos factores de modo a melhorar o controlo da doença em fauna silvestre |

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

Madalena Vieira-Pinto

mmvpinto@utad.pt

www.utad.pt

Historia

Desde 2001 que o trabalho desenvolvido relativo à tuberculose (Tb) animal se centra prioritariamente no âmbito da avaliação/inspeção sanitária de espécies de caça maior. Inicialmente, face à observação do primeiro caso (2001) de Tb em caça, desenvolveram-se, sobretudo, estudos analíticos observacionais transversais (*Cross sectional*) com o intuito de incrementar o conhecimento relativo à ocorrência de lesões, distribuição geográfica e localização/tipologia das lesões observadas no decurso da avaliação/inspeção sanitária das peças de caça maior.

Após 2004, com a publicação do Regulamento (CE) N.º 853/2004 de 29 de Abril de 2004 que estabelece as regras de higiene dos géneros alimentícios, o qual prevê a “Formação dos caçadores em sanidade e higiene” para poderem realizar um exame inicial dos animais no local da caçada, começou a desenvolver trabalho nesta área, com a edição de manuais e a edição de cursos de formação de caçadores. Desde 2008 que a UTAD é detentora de cursos de exame inicial de caça homologados pela Autoridade Veterinária Competente (Direção Geral de Alimentação e Veterinária e Alimentação – DGAV). Em 2011, com a publicação em Portugal do Edital N.º 1 em Tuberculose em caça maior, que estabelece uma Área Epidemiológica de Risco para os Animais de Caça Maior, obrigando à presença de um Médico Veterinário para efetuar o exame inicial, desenvolveu-se um modelo de curso de formação ajustado para os Médicos Veterinários responsáveis por estas ações, tendo o primeiro curso sido realizado em junho de 2012. No âmbito destas formações a contribuição para uma maior sensibilização relativamente a alguns fatores de risco e medidas de controlo, associados ao exame inicial, relativos à transmissão (animais e Homem) do agente de *Mycobacterium bovis*, pode ajudar a promover a sua aplicação na prática com um efeito benéfico para a sua mitigação. Para substanciar esta informação desenvolveu-se um trabalho para avaliar as condições de realização do exame em diversas zonas de caça, relativamente às infraestruturas, utensílios, proteção de operadores e procedimentos de higiene.

Adicionalmente considera-se que, as ações de formação, ao apresentarem protocolos harmonizados de procedimentos inspetivos das carcaças e respetivas vísceras, baseados na investigação e conhecimento, permitem uma mais eficaz deteção das lesões e a obtenção de resultados analisáveis comparativamente. Esta informação, também ela harmonizada, é de extrema importância para a correta interpretação da evolução da distribuição espaço-temporal da Tb, essencial para o desenho, implementação ou reajuste dos sistemas de monitorização e/ou de vigilância, assim como para uma alocação economicamente eficaz dos recursos humanos e financeiros.

Atualidade

Na atualidade continua a dedicar-se à formação de caçadores em matéria de exame inicial, a qual tem vindo a ser cada vez mais solicitada pelo setor da caça. Avizinha-se, para este setor, uma maior responsabilidade direta sobre a sanidade cinegética (quer a nível dos animais quer a nível dos seus produtos edíveis – carne) devendo este reconhecer que a presença de doenças nos animais de espécies cinegéticas não só compromete diretamente as suas populações como também pode potencialmente afetar outras espécies selvagens, assim como animais domésticos e, até mesmo o Homem. Para o desempenho desta responsabilidade, o setor deverá consolidar conhecimentos na área, como por exemplo através de cursos de formação especializada, assim como deverá/poderá procurar a ciência para se aliar como parceira na mitigação coerente e sustentada dos problemas identificados. Um caçador formado e informado, mais atento e consciente constitui, de facto, um elemento fundamental para a sanidade cinegética e uma mais-valia para o setor.

A classe Médico-veterinária e academia, deverá igualmente estar preparada para dar respostas concretas e eficazes face às necessidades do setor em matéria de controlo de Tb. Neste âmbito, considerando que cada zona de caça é uma unidade epidemiológica com características próprias, cujo modelo de intervenção no controlo de Tb deverá ser ajustado às suas particularidades, orientam-se trabalhos no sentido de promover a utilização dos resultados do exame inicial como uma fonte de informação de extrema relevância para o delineamento e direcionamento de estratégias eficazes de controlo baseados no risco, as quais deverão ser equacionadas pelo Médico Veterinário em conjunto com a entidade gestora da zona de caça. Adicionalmente, e em complemento à avaliação sanitárias das peças de caça, efetuam-se trabalhos, em colaboração com outras instituições de investigação, no âmbito da avaliação de fatores de risco nas zonas de caça. Em conjunto, esta informação é trabalhada a nível de cada uma das zonas de caça, permitindo desenhar e/ou ajustar planos de biossegurança específicos. Os principais fatores de risco que têm sido alvo de estudo incluem as densidades, contacto com outras espécies, vedações, locais de armazenamento do alimento, pontos de abeberamento e de alimentação.

Futuro

Face à importância que reconhece na formação em matéria de examinação de caça, continuará a desenvolver atividades de formação e divulgação de conhecimento, perspetivando, adicionalmente, como trabalho futuro a criação de um grupo de trabalho a nível europeu para melhorar e harmonizar os conteúdos programáticos das ações de formação para caçadores.

A avaliação de risco relativa à Tb será ampliada tendo por base o conceito de “Uma Só Saúde” uma vez que, associado às práticas cinegéticas existem diversos fatores de risco que podem promover a uma transmissão desta doença para o Homem. ■

Resumo

Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB.

| Campo | Resultado | Aplicación | Referencia |
|--|---|---|---|
| Avaliação/inspeção sanitária das peças de caça maior | Observação de lesões de Tb em caça, estudos analíticos observacionais transversais (Cross sectional) | Formação dos caçadores em sanidade e higiene, com edição de manuais e a construção e realização de cursos de formação de caçadores (exame inicial) homologados pela Autoridade Competente (DGAV*) | (European Union, 2004; Vieira-Pinto <i>et al.</i> , 2005, 2008, 2014) |
| Avaliação/inspeção sanitária das peças de caça maior e análise da distribuição espaciotemporal da Tb | Publicação em Portugal do Edital Nº 1 em Tuberculose em caça maior, que estabelece uma Área Epidemiológica de Risco para os Animais de Caça Maior | Presença de um Médico Veterinário para efetuar o exame inicial em ações de caça maior em área de risco, e cursos de formação ajustados para os Médicos Veterinários desde junho de 2012. | (Alberto, 2009; Alberto <i>et al.</i> , 2011; Direção Geral de Alimentação e Veterinária, 2011; Vieira-Pinto <i>et al.</i> , 2011, 2015; Gonçalves, 2015) |
| Avaliação/inspeção sanitária das peças de caça maior e fatores de risco de transmissão de Tb | Identificação de fatores de risco e de medidas de controlo pre-harvest e associadas ao exame inicial. Promoção da sua aplicação na prática | Aplicação de medidas de biossegurança ajustadas, de Boas Práticas de Higiene no decurso do exame inicial e regras de segurança alimentar | (Vieira-Pinto, 2014, 2016, 2017; Abrantes, 2017; Abrantes <i>et al.</i> , 2017, 2018) |

Objetivos inmediatos y su beneficio potencial para el control de TB.

| Campo | Objetivo | Beneficio |
|--|--|---|
| Avaliação/inspeção sanitária das peças de caça maior | Formar caçadores em matéria de exame inicial e procurar a ciência para se aliar como parceira na mitigação coerente e sustentada dos problemas identificados | Caçador formado e informado, mais atento e consciente como fator chave no controlo das doenças da caça maior, que podem também afetar outras espécies selvagens, animais domésticos e o Homem |
| Monitorização e controlo baseado no risco | Promover a utilização dos resultados do exame inicial como fonte de informação para o delineamento e direcionamento de estratégias eficazes de controlo baseados no risco; avaliação de fatores de risco nas zonas de caça | Trabalhar a informação a nível de cada uma das zonas de caça, permitindo desenhar e/ou ajustar planos de biossegurança específicos |
| Formação de caçadores | Criação de um grupo de trabalho a nível europeu pela formação de caçadores | Melhorar e harmonizar os conteúdos programáticos das ações de formação para caçadores |
| Avaliação de risco para o Homem | Aplicação tendo por base o conceito de “Uma Só Saúde” | Mitigação de riscos da transmissão desta doença para o Homem |

Departamento de Biologia & CESAM, Universidade de Aveiro

Carlos fonseca

cfonseca@ua.pt

www.ua.pt

www.cesam.ua.pt

J

História

Nas últimas décadas, as populações de ungulados silvestres têm vindo a aumentar de forma considerável um pouco por toda a Europa, como resultado da intervenção humana direta (e.g., reintroduções para fins cinegéticos ou conservacionistas), da renaturalização dos habitats no meio rural e de processos naturais relacionados com a sua dinâmica populacional (Torres *et al.*, 2015, 2016; Fonseca *et al.*, 2017; Valente *et al.*, 2017; Carvalho *et al.*, 2018c). Esse crescimento generalizado trouxe novas oportunidades de aproveitamento destes recursos faunísticos, mas coloca também novos desafios no que se refere à sua gestão.

Atualidade

Os ungulados silvestres têm um inegável valor ecológico e socioeconómico. Em termos ecológicos, salientam-se o seu papel na composição, estruturação e dinâmica das comunidades vegetais (Smit and Putman, 2011) e a sua importância na manutenção de populações viáveis de grandes predadores (Cruz *et al.*, 2014; Torres *et al.*, 2018). Por outro lado, no contexto social e económico, os ungulados apresentam um elevado potencial para o ecoturismo e são, sobretudo, importantes recursos cinegéticos, cuja exploração sustentada e viabilidade populacional dependem fortemente da aplicação de medidas de gestão adequadas (Carvalho *et al.*, 2018a; Carvalho, 2019).

Em Portugal, a gestão cinegética das populações de ungulados não é suportada, de um modo geral, por um acompanhamento rigoroso e contínuo que permita conhecer com precisão e exatidão a sua situação real e respetivas tendências. Para além disto, essa mesma gestão carece, frequentemente, da execução de planos de exploração adaptados à realidade de cada espécie ou território. A gestão inadequada destas populações pode ter consequências indesejadas ao nível da abundância e da estrutura populacional (Torres-Porras *et al.*, 2014), da condição sanitária, corporal e fisiológica dos indivíduos (Vicente *et al.*, 2007; Santos, 2015; J. P. V. Santos *et al.*, 2018b, 2018a), e ainda nos próprios habitats e nas populações de outras espécies (Carpio *et al.*, 2014b, 2014a; Perea *et al.*, 2014). Se, por um lado, a caça excessiva pode conduzir à progressiva diminuição ou, em casos mais extremos, ao desaparecimento das populações, levando a um desequilíbrio do normal funcionamento dos ecossistemas, por outro lado, as práticas de gestão que promovem a superabundância populacional podem originar também diversos outros problemas ambientais e ecológicos [*i.e.*, consumo excessivo da vegetação, competição interespecífica; (Perea *et al.*, 2014, 2015)], e sanitários [*i.e.*, maior probabilidade de transmissão de doenças; (Gortázar *et al.*, 2006)]. A monitorização das populações silvestres é uma ferramenta fundamental para a definição de estratégias de gestão e de conservação eficientes e integradas (Valente *et*

al., 2014, 2016). Idealmente, os programas de monitorização devem considerar uma abordagem multidisciplinar, contemplando: i) o conhecimento do tamanho, da estrutura e da dinâmica das populações (Valente *et al.*, 2014); ii) o acompanhamento de variáveis fisiológicas e de outros indicadores da condição física dos animais (e.g., estado nutricional, desempenho reprodutivo e estado sanitário) (J. P. V. Santos *et al.*, 2018b, 2018a); iii) a avaliação do habitat e da sua capacidade de carga (Carvalho *et al.*, 2012, 2018b, 2018c); e iv) o estudo dos padrões de uso e seleção do habitat por parte das espécies (Torres *et al.*, 2011, 2012). Vários métodos e técnicas têm sido desenvolvidos e validados cientificamente para monitorizar as populações de ungulados silvestres (Acevedo *et al.*, 2008; Valente *et al.*, 2016), permitindo aceder a informação valiosa sobre a condição física dos animais e a sua situação populacional geral (Santos *et al.*, 2013, 2014, J. P. V. Santos *et al.*, 2018b, 2018a). A investigação na área dos ungulados deu um importante salto qualitativo em Portugal, sobretudo na última década, e vários estudos têm sido desenvolvidos de norte a sul do país, alguns deles de carácter transfronteiriço, no sentido de integrar os conhecimentos adquiridos sobre a biologia, ecologia e dinâmica populacional das espécies com aspetos relacionados com a sua gestão (Santos, 2015) (Santos 2015). Muitos desses trabalhos de investigação incluem uma componente de monitorização relevante e, por este motivo, constituem uma ferramenta de grande utilidade para ajudar na gestão das populações de ungulados em diversas áreas do nosso país.

Futuro

No entanto, apesar desse avanço, a grande maioria da gestão cinegética continua a realizar-se sem uma base e um acompanhamento técnico-científicos e também sem planos de gestão abrangentes e adequados às necessidades das espécies e dos territórios. Neste sentido, seria desejável que existisse uma maior colaboração e articulação entre as universidades e entidades gestoras, sejam elas públicas ou privadas, e também caçadores,

Figura 2. Feto de veado.



Figura 1. Resultado de uma montaria no centro de Portugal (serra da Lousã, 2019).



Figura 3. Monitorização da população de cervídeos da serra da Lousã por métodos diretos (pontos fixos).



com o objetivo de criar uma rede de monitorização, com metodologias uniformizadas, que permitisse um acompanhamento contínuo das populações e comparações espaço-temporais das suas tendências, que tornasse possível um uso mais adequado e proveitoso destes recursos naturais e que pudesse funcionar também como ferramenta de diagnóstico, ajudando a prevenir potenciais problemas. A este nível, seria ainda extremamente importante reforçar a colaboração entre Portugal e Espanha no sentido de promover uma gestão transfronteiriça mais coordenada e eficaz (Fonseca *et al.* 2014). ■

Resumo

Principais resultados e suas aplicações para o controlo da TB.

| Campo | Resultado | Aplicación | Referencia |
|--------------------------|--|---|---|
| Monitorização/ Gestão | Análise do aumento das populações de ungulados silvestres e consequências da gestão inadequada | Execução de planos de exploração adaptados à realidade de cada espécie ou território. | (Torres <i>et al.</i> , 2015, 2016; Fonseca <i>et al.</i> , 2017; Valente <i>et al.</i> , 2017; Carvalho <i>et al.</i> , 2018c) |
| Monitorização | Otimização de procedimentos para avaliar a condição corporal e níveis de stress fisiológico em veados, fatores que podem determinar o grau de suscetibilidade dos indivíduos de uma população a doenças, incluindo TB | Protocolos mais simples, rápidos e com menos custos para avaliar a condição física em veados e outras espécies de cervídeos. | (Santos <i>et al.</i> , 2013, 2014) |
| Monitorização/ Gestão | Compreensão de como os fatores intrínsecos, populacionais, ambientais e práticas de gestão cinegética afetam a condição física do veado nos ecossistemas mediterrânicos da Península Ibérica e implicações para a gestão das suas populações | Melhoria da gestão das populações de veado ibéricas através de uma compreensão mais integrada de como diferentes fatores afetam a condição física dessa espécie | (Santos, 2015; J. P. V. Santos <i>et al.</i> , 2018b, 2018a) |

Objetivos imediatos e benefício potencial para o controlo da TB.

| Campo | Objetivo | Benefício |
|--------------------------|--|--|
| Monitorização/ Gestão | Compreender a relação entre diferentes indicadores de condição física e a prevalência e incidência de TB em populações de ungulados silvestres sujeitas a condições ambientais e sistemas de gestão cinegética distintos na Península Ibérica. | Melhoria da gestão das populações de ungulados silvestres e a adaptação dessa gestão às distintas realidades/contextos no sentido de controlar e/ou reduzir a prevalência de TB. |
| Gestão | Reforçar a colaboração entre Portugal e Espanha. | Gestão transfronteiriça mais coordenada e eficaz para controlo sanitário. |

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

Marisa Ana Andrada

marisaana.andrada@ulpgc.es

www.ulpgc.es

Historia

Desde el 2005 hasta la fecha, la División de Histología y Patología Animal (HAP) del Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria (IUSA), de la Universidad de las Palmas de Gran Canaria, tiene como uno de los objetivos principales 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 bovina en el archipiélago canario.

Los trabajos de control y erradicación de la tuberculosis bovina empezaron hace 20 años con la técnica María del Carmen Pieltain Cansado, quien ejerció un papel fundamental con su labor durante todos estos años. El IUSA conjuntamente, con los ganaderos, mataderos, técnicos y especialistas, así como los laboratorios de referencia regional y nacional han sido fundamentales en el proceso.

El IUSA, mediante convenios con la Dirección General de Ganadería de la Comunidad Autónoma, participó y participa en el estudio anatomopatológico de animales positivos y dudosos a la prueba de intradermoreacción (IDT), en el marco de lucha contra las enfermedades producidas por el Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTC), 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.

Actualidad

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 coordina con la Dirección General de Ganadería, quienes coordinan 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 descritos en el manual de toma de muestras:

https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/protocolovigtbmataderos2018_tcm30-436763.pdf

https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/manual_procedimiento_muestras_2017_v2_tcm30-430347.pdf

Las muestras recogidas para los diferentes proyectos se han clasificado en dos grupos en función del estudio a realizar:

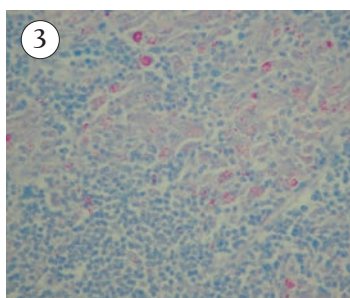
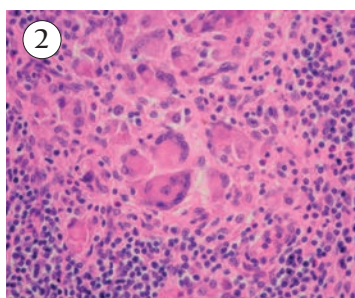
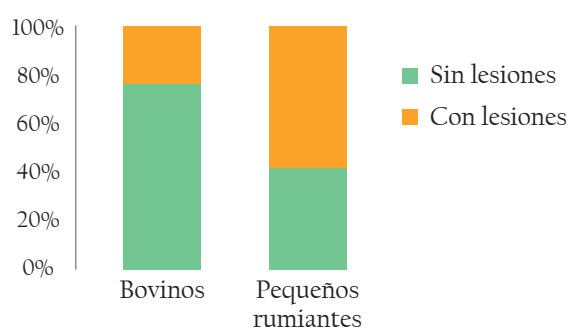
- Linfonodos retrofaríngeos, mediastínicos, traqueobronquiales, preescapulares, hepáticos y mamarios (y otros linfonodos y/o vísceras con lesiones) para el estudio de la tuberculosis bovina-caprina.
- Linfonodos mesentéricos e ileocecal y válvula ileocecal para el estudio de la paratuberculosis bovina-caprina.

Futuro

Se continuará con el estudio de vigilancia de la enfermedad en los mataderos, y con el seguimiento de explotaciones que decidan vacunar frente a la paratuberculosis, 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. ■

Figura 1. (1) Representación del porcentaje de lesiones granulomatosas observadas en bovinos y pequeños rumiantes IDT+ o dudoso con lesiones granulomatosas inspeccionadas en matadero. (2) Linfonodo con granulomas de grado II según la clasificación descrita previamente (Wangoo et al., 2005), compuestos principalmente por macrófagos epitelioides con citoplasma amplio y acidófilo, y acompañados de células gigantes multinucleadas tipo Langhans. 40X. (3) Presencia de múltiples bacilos Z-N positivos. 40X.

1 Lesiones granulomatosas de animales IDT+ o dudoso (2005-2018)



Resumen

Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB.

| Campo | Resultado | Aplicación | Referencia |
|---|--|---|---|
| Diagnóstico Anatomopatológico en bovinos y pequeños rumiantes IDT+ o dudosos 2005-2018 | Un total de 1246 animales IDT+ o dudoso muestreados en matadero (725 bovinos y 521 pequeños rumiantes), presentando lesiones granulomatosas en uno o más linfonodos y/o intestino en un 23.72% y 60.26 respectivamente. Fig. 1 | Estudio anatomopatológico en matadero y laboratorial IUSA | (Dirección General de Ganadería and Gobierno de Canarias, 2018) |
| Estudio anatomopatológico de linfonodos en caprinos IDT+ | En 500 muestras, se observaron los 4 grados, siendo el grado I y IV los más frecuentes, pudiendo indicar fases activas y de diseminación. La inspección post mortem y los estudios histopatológicos tuvieron una sensibilidad y especificidad del 72-94% y 59-99%, respectivamente | Aplicación de la clasificación descrita previamente (Wangoo <i>et al.</i> , 2005) en 500 linfonodos caprinos IDT+ | (Pérez <i>et al.</i> , 2013; Pérez-García <i>et al.</i> , 2013) |
| Experiencia piloto: Estudio sobre el efecto de la vacunación frente a la PTBC caprina (2014-2016) | a) Estudio Serológico frente a <i>Mycobacterium avium</i> subespecie paratuberculosis (MAP) sobre el 20 % del censo de cada explotación. El % varió entre un 3 y un 60% de animales positivos entre las diferentes granjas previo a la vacunación. b) Estudio anatomopatológico: Necropsia y matadero. Se analizaron 39 animales, predominando lesiones en un 67% lesiones de linfadenitis granulomatosas y enteritis granulomatosas, y un 33% presentaron otras lesiones no asociadas a enfermedad producidas por micobacterias | Evaluar la interferencia de la respuesta inmune vacunal con la prueba de la IDT comparada, en 5 granjas seleccionadas indemnes de tuberculosis al menos en los 5 últimos años | (Quesada-Canales <i>et al.</i> , 2013; Dirección General de Ganadería and Gobierno de Canarias, 2016) |

Objetivos inmediatos y su beneficio potencial para el control de TB.

| Campo | Objetivo | Beneficio |
|--|--|--|
| Diagnóstico Anatomopatológico en bovinos y pequeños rumiantes IDT+. Estudio de la interferencia con la IDT con otras micobacterias | Utilización de la histopatología para la optimización del diagnóstico macroscópico de TBC y PTBC en Bovinos y Pequeños rumiantes y en animales de vida salvaje (Dirección General de Ganadería and Gobierno de Canarias, 2016) | Optimizar el rendimiento de la vigilancia de la TBC en los mataderos. Con el estudio histopatológico se ha incrementado la identificación de microgranulomas hasta en un 50% más del diagnóstico realizado en la inspección post mortem, y ha permitido diferenciar granulomas no tuberculosos |

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

Lucía de Juan Ferré

dejuan@visavet.ucm.es

www.visavet.es

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). Los miembros del EU-RL son a su vez investigadores del Servicio de Micobacterias del Centro VISAVET que 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, caprino principalmente, y silvestres. En ambos casos, existe una colaboración activa con el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, así como otras instituciones nacionales e internacionales. 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, principalmente en bovino; 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.

Actualidad

El EU-RL tiene entre sus actividades principales el desarrollo, evaluación y mejora de las técnicas diagnósticas de tuberculosis, principalmente aquellas de aplicación en el ganado bovino, aunque también en otras especies que sean de interés por ser reservorios y/o jugar un papel importante en la epidemiología de la enfermedad. De especial interés han sido los recientes estudios para valorar el efecto del lugar de inoculación de la PPD bovina en el rendimiento de la prueba de intradermotuberculinización en ganado bovino, así como los realizados con el objetivo de definir un protocolo armonizado de la técnica de detección de IFN- γ , para lo cual se han tenido que evaluar los parámetros relacionados con esta técnica *in vitro* cuya modificación podía afectar a los resultados. A esto hay que sumar que la actividad del EU-RL ha sido fundamental para demostrar la fiabilidad de los sistemas de inoculación de las PPDs más comúnmente empleados en Europa, para poner a punto y mejorar el diagnóstico *in vivo* de la tuberculosis en camélidos y para la evaluación de técnicas experimentales de diagnóstico. En este sentido, el EU-RL ha realizado estudios de serología basada en el complejo proteico P22 o la técnica de *phage-RPA*. El EU-RL posee amplia experiencia en la determinación de la potencia de la PPD bovina en cobayas y ganado bovino empleando diferentes protocolos, tanto en animales infectados de forma natural como experimentalmente, actividad que realiza desde su designación. Actualmente, realiza pruebas de potencia en colaboración con la OIE para la evaluación de dos PPDs bovinas candidatas a sustituir en un futuro al Estándar Internacional empleado como referencia en las pruebas de potencia, que tiene más de 20 años de antigüedad y está próximo a agotarse. Por último, en relación a

los factores que pueden afectar al rendimiento de las pruebas diagnósticas, el EU-RL está llevando a cabo estudios dirigidos a evaluar el efecto de la administración en los animales de sustancias de diferente naturaleza de forma fraudulenta que se sospecha que puedan estar aplicándose de forma puntual con el objetivo de modificar los resultados de las pruebas diagnósticas. Estos estudios servirán de base para determinar el efecto real que puedan tener estas actividades ilícitas que suponen un fuerte menoscabo en el avance de los programas de erradicación, permitiendo, además, el desarrollo de técnicas para demostrar dicho fraude en caso de sospecha.

Respecto al diagnóstico *post-mortem*, las investigaciones del EU-RL se centran principalmente en evaluar y mejorar los protocolos de cultivo bacteriológico empleados en Europa con el objetivo de maximizar la sensibilidad, así como en evaluar y mejorar las técnicas basadas en PCR empleadas para la identificación y caracterización molecular de las micobacterias. El EU-RL trabaja en la puesta a punto y validación de la PCR directa a partir de tejido como técnica complementaria y/o de sustitución del cultivo, que permitiría agilizar la calificación sanitaria y el establecimiento de las medidas de prevención y control en las explotaciones. Además, desde el Centro VISAVET se gestionan las bases de datos que permiten posteriormente la realización de estudios epidemiológicos: 1) mbovis.org, que asigna la nomenclatura de espoligotipado a nivel internacional; 2) mycoDB.es, que recoge todos los aislados españoles identificados como complejo *M. tuberculosis* a nivel de municipio desde el año 1996 y de distintas especies animales; y 3) mycoDB.eu, que agrupa los espoligotipos detectados a nivel europeo por países, año y especie animal.

Para la estandarización y armonización de los protocolos oficiales de diagnóstico, el EU-RL organiza, evalúa y realiza el seguimiento de ensayos de intercomparación de cultivo microbiológico y extracción directa de ADN, identificación y caracterización molecular, IFN- γ , potencia biológica de PPD bovina e histopatología.

Figura 1. De izquierda a derecha: (a) Estudios para evaluar el lugar de inoculación de la PPD bovina; (b) Prueba de potencia de tuberculina bovina en cobayas; (c) Cultivo microbiológico y estudio de técnicas complementarias; (d) Organización de estudios comparativos (ej. histología).



Futuro

Las actividades futuras del EU-RL están ligadas esencialmente a las necesidades que vayan surgiendo en lo relativo al diagnóstico y control de la tuberculosis bovina en Europa y que la Comisión Europea prioriza al definir el programa de trabajo para cada anualidad. Partiendo de esta base, el EU-RL pretende seguir trabajando en las actividades que viene desempeñando, siendo un pilar fundamental el desarrollo, evaluación y mejora de las técnicas diagnósticas de la tuberculosis en el ganado bovino. En este sentido, la evaluación de diferentes protocolos en la prueba de potencia en cobayas permitirá determinar factores críticos que puedan afectar a su precisión y fiabilidad, facilitando establecer un protocolo armonizado que favorezca la comparación de resultados entre laboratorios ante la falta, al menos de momento, de métodos alternativos que no requieran del empleo de animales vivos. Por otro lado, el EU-RL seguirá investigando para la mejora

de las técnicas diagnósticas oficiales actuales, ya sea mediante modificaciones de los protocolos o el empleo de antígenos alternativos, y evaluando otras técnicas experimentales o no oficiales, fundamentalmente aquellas plataformas basadas en la extracción directa de ADN o en la detección de anticuerpos específicos. 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 | Fiabilidad de las jeringas Dermojet y McLintock como causantes de reacciones inespecíficas | Diseños de programas de erradicación de tuberculosis bovina | (Díez-Guerrier <i>et al.</i> , 2018; Roy <i>et al.</i> , 2019) |
| Diagnóstico | Rendimiento de pruebas diagnósticas de tuberculosis en llamas y alpacas | Recomendación de técnicas diagnósticas de tuberculosis para pruebas ante-mortem en camélidos del Nuevo Mundo | (Bezós <i>et al.</i> , 2013, 2014; Infantes-Lorenzo <i>et al.</i> , 2018) |
| Diagnóstico | Rendimiento de las técnicas serológicas para maximizar detección de animales infectados. | Técnicas complementarias a las pruebas oficiales para incrementar sensibilidad | (Casal <i>et al.</i> , 2017; Bezós <i>et al.</i> , 2018) |
| Diagnóstico | Efecto del lugar de la inoculación de la PPD bovina sobre la sensibilidad/especificidad de la prueba IDTB | Diseño de programas de erradicación de tuberculosis bovina | (Casal <i>et al.</i> , 2015) |
| Diagnóstico | Validación de PCR en tiempo real para diagnóstico de tuberculosis en tejidos | Diseños de programas de erradicación de tuberculosis bovina | (Lorente-Leal <i>et al.</i> , n.d.) |
| Diagnóstico | Proporcionar material de referencia. Organización de ensayos de intercomparación. Estandarización de protocolos a nivel europeo | Puesta a punto de protocolos y estandarización. Aseguramiento de la calidad de los resultados | Protocolos y material de referencia del EU-RL. Evidenciar la competencia técnica según ISO 17025. |
| Epidemiología | Centralizar la información molecular | Epidemiología molecular | (Rodríguez <i>et al.</i> , 2011; Rodríguez-Campos <i>et al.</i> , 2012; Palacios <i>et al.</i> , 2016) |

Objetivos inmediatos y su beneficio potencial para el control de TB.

| Campo | Objetivo | Beneficio |
|---------------|---|--|
| Diagnóstico | Validación de un nuevo Estándar Internacional de PPD bovina | Mejorar las pruebas de potencia de la PPD bovina en cobayas y ganado bovino. |
| Diagnóstico | Efecto del uso fraudulento de los corticoides administrados por diferentes vías en los resultados de la prueba IDTB | Mejora de los programas de erradicación de tuberculosis. Desarrollo de sistemas de detección de fraudes. |
| Diagnóstico | Evaluación de efecto sensibilizante causado por micobacterias no tuberculosas en el diagnóstico de la tuberculosis | Mejorar el diagnóstico de tuberculosis en ganado bovino y otras especies susceptibles. |
| Diagnóstico | Validación de métodos complementarios o alternativos al cultivo bacteriológico | Reducción en el tiempo de recuperación de la calificación de las explotaciones |
| Epidemiología | Asignación de nomenclatura de espigotipado y mantenimiento de bases de datos a nivel nacional e internacional | Unificar la nomenclatura de cepas y centralización de la información epidemiológica a nivel molecular |

Sanidad y Biotecnología (SaBio), Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos IREC (Universidad de Castilla – La Mancha y CSIC)

Christian Gortázar

christian.gortazar@uclm.es

www.irec.es

Historia

El grupo de investigación 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 celebra sus primeros 20 años, ha contribuido a que la Universidad de Castilla – La Mancha figure en 2018 entre las 50 mejores universidades del mundo (tercera española) en el área de ciencias veterinarias, según el ranking de Shanghai. Las líneas de investigación del IREC abarcan todos los aspectos de la tuberculosis: diagnóstico, epidemiología y control.

Actualidad

La actividad investigadora del IREC resulta inseparable de la de sus colaboradores. Dentro de la Península Ibérica existen fuertes lazos con VISAVET y el EURL (temas: diagnóstico, vacunas, epidemiología); el ISCIII (diagnóstico); NEIKER y SERIDA (vacunas); Universidad de León (tejón, ovino, epidemiología); CiBio-Porto (genética y epidemiología); Universidad de Córdoba (bioseguridad) y muchos otros grupos. Además, existe colaboración con diversas empresas entre las que cabe destacar la spin-off del grupo, Sabiotec. El IREC presta servicios (investigación contratada) a numerosas administraciones públicas incluyendo la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), el Ministerio de Agricultura y la práctica totalidad de las CCAA. A escala internacional el IREC trabaja sobre TB animal en colaboración con numerosos grupos de investigación de los países de nuestro entorno (especialmente Portugal y Reino Unido) así como con grupos de África, América y Asia. En el ámbito de la monitorización poblacional de fauna silvestre, como base para la evaluación de riesgos, se colabora con organismos de investigación y gestión de prácticamente toda Europa, materializado en varios proyectos internacionales coordinados desde el IREC.

Futuro

El grupo SaBio del IREC cuenta con 50 integrantes de los cuales 10 son investigadores con capacidad de liderar proyectos competitivos (Figura 1). En consecuencia, las líneas de investigación y la red de colaboradores se encuentran en continuo crecimiento. Algunos aspectos que reciben mayor atención en la actualidad, y darán lugar a resultados de impacto y susceptibles de transferencia tecnológica incluyen los siguientes:

1. Epidemiología de la tuberculosis en sistemas multi-hospedador. Esta línea de investigación forma la base de la actividad del grupo y continúa dando resultados importantes. Se investigan las tendencias temporales de la tuberculosis en hospedadores silvestres intentando averiguar los factores que determinan esas tendencias (Proyecto WildDriver y Plan nacional AGL2016-76358). En colaboración con la Universidad Herriot-Watt se desarrollan modelos matemáticos que permiten evaluar las intervenciones ya realizadas y optimizar el uso futuro de las diferentes herramientas de control sanitario. Mediante técnicas telemétricas avanzadas (GPS-GSM, loggers de proximidad) y diagnóstico molecular, se cuantifican los contactos en la interfase doméstico-silvestre en ambientes mediterráneos, y se determina la estructura de los contactos entre los diferentes elementos del sistema (cerdo, bovino, fauna silvestre, medio ambiente). Ello permite evaluar riesgos de contacto y transmisión. Por primera vez, se van a integrar los conocimientos a escala local de la ecología de la interacción fauna/ganado con la distribución espacial a gran escala de ambos grupos. Los modelos epidemiológicos permitirán discernir la contribución de la fauna silvestre a la incidencia de TB en explotaciones del centro y sur de España, priorizar las áreas de actuación, así como evaluar la relación coste-beneficio de las diferentes opciones de manejo preventivo.
2. Armonización y estandarización del seguimiento de poblaciones de fauna a escala local, nacional e internacional. Desarrollo de nuevas formas de monitorización poblacional y vigilancia sanitaria integrada. Esta línea tiene relación con la tuberculosis y con otras enfermedades emergentes en Europa, como la peste porcina africana. Se está modelando la distribución y abundancia de ungulados silvestres, así como la interfase física con el ganado, como base para el análisis de riesgos tanto a nivel nacional como internacional. El IREC lidera el consorcio EnetWild para EFSA (www.enetwild.com). En el futuro se aplicará ciencia ciudadana como nueva fuente de información sobre la distribución de hospedadores y se evaluará su potencial aplicado en Europa.
3. Investigación y aplicación de mejoras en bioseguridad en ganadería. Esta línea nació en relación con el bovino extensivo, buscando implicar al ganadero en la mitigación de riesgos de tuberculosis. Actualmente se está valorando la eficacia de la aplicación de protocolos estandarizados pero específicos de explotación en bovino (lo que requiere de una serie temporal de información lo suficientemente larga). Esta línea ha evolucionado hacia otras especies y sistemas de producción (cerdo en extensivo) y cuenta con importantes colaboraciones con las administraciones públicas y asociaciones ganaderas.
4. El desarrollo de vacunas es una actividad fundamental del grupo SaBio y su red de colaboradores nacionales e internacionales. Se trabaja en aspectos básicos, buscando entender los mecanismos de protección, así como la intensidad y especificidad de dicha protección, y en aspectos aplicados empleando para ello modelos animales que incluyen pez cebra, cerdo/jabalí, cabra y bovino, entre otros. ■

Figura 1. Componentes del grupo SaBio-IREC.



Resumen

Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB.

| Campo | Resultado | Aplicación | Referencia |
|---------------|---|---|---|
| Diagnóstico | Nuevas técnicas serológicas para la detección de anticuerpos específicos en múltiples especies | Prueba de elección para vigilancia epidemiológica en suidos y en carnívoros Prueba de screening para rumiantes | (N. Santos <i>et al.</i> , 2018; Infantes-Lorenzo <i>et al.</i> , 2019a; Thomas <i>et al.</i> , 2019b, 2019a) |
| Diagnóstico | Uso de ADN ambiental para detección de MTC en diversas matrices | Análisis epidemiológicos y evaluación de riesgos, bioseguridad | (Santos <i>et al.</i> , 2015b; Barasona <i>et al.</i> , 2017b, 2017a) |
| Diagnóstico | Refinamiento de la prueba IDTB en ciervo y gamo | Diagnóstico y protocolos de testado y eliminación selectiva en cérvidos | (Fernández-de-Mera <i>et al.</i> , 2009; Jaroso <i>et al.</i> , 2010) |
| Epidemiología | Identificación de los reservorios silvestres más importantes para el mantenimiento de la TB en Iberia. Papel del jabalí como reservorio clave | En sistemas multi-hospedador difícilmente se logrará la erradicación sin contemplar a todos los actores involucrados – jabalí, ciervo y gamo en los ambientes mediterráneos ibéricos | (Gortázar <i>et al.</i> , 2008, 2017; Naranjo <i>et al.</i> , 2008) |
| Epidemiología | Identificación de factores de riesgo que determinan la prevalencia de TB en fauna silvestre: densidad, agregación, distribución de puntos de agua, alimentación suplementaria | Posibilidades para una gestión cinegética con consideración de aspectos sanitarios | (Vicente <i>et al.</i> , 2007, 2013; Gortázar <i>et al.</i> , 2011) |
| Epidemiología | Armonización de métodos de determinación de abundancia en el principal reservorio: el jabalí | Posibilidad de determinar abundancia poblacional del jabalí de forma estandarizada y comparable para desarrollo de investigación y programas de monitorización de la fauna (y del manejo) | Consorcio ENETWILD 2018 |
| Epidemiología | Identificación de factores de riesgo que determinan la prevalencia, incidencia y recurrencia de TB en la interfase | Posibilidades para una gestión ganadera con consideración de los factores de riesgo de la fauna silvestre | (Rodríguez-Prieto <i>et al.</i> , 2012; Martínez-Lopez <i>et al.</i> , 2014; LaHue <i>et al.</i> , 2016) |
| Epidemiología | Relación entre variabilidad genética, resistencia genética y tuberculosis en ciervo y jabalí | Es deseable conservar la diversidad genética en poblaciones naturales. Es posible seleccionar poblaciones domésticas en favor de mayor resistencia | (Acevedo-Whitehouse <i>et al.</i> , 2005; Queirós <i>et al.</i> , 2016, 2018, 2019) |
| Epidemiología | Mortalidad significativa de jabalíes por tuberculosis clínica. Descubrimiento de ADN del CMT en muestras ambientales y vías de excreción del CMTB en el jabalí | A considerar en zonas de alta prevalencia, así como en la interacción con el sector caza | (Barasona <i>et al.</i> , 2017b, 2017a) |
| Epidemiología | Se describe el uso de recursos compartidos en la interfase, la interacción entre individuos, y su relación con el riesgo de TB | De interés para determinar puntos y momentos de máximo riesgo, en ganaderías extensivas de porcino y bovino | (Kukielka <i>et al.</i> , 2013; Barasona <i>et al.</i> , 2014, 2017b; Carrasco-García <i>et al.</i> , 2016; Cowie <i>et al.</i> , 2016; Laguna <i>et al.</i> , 2018; Triguero-Ocaña <i>et al.</i> , 2019) |
| Control | Aceptación social de las medidas de bioseguridad por parte de los ganaderos y sector cinegético | Punto de partida para desarrollar programas de bioseguridad eficaces, aceptados y aplicables | (Cowie <i>et al.</i> , 2015) |
| Control | Controlar jabalíes reduce incidencia de TB en bovinos y ciervo | Aplicable en combinación con otras estrategias, como la vacunación | (Boadella <i>et al.</i> , 2012; Tanner <i>et al.</i> , 2018) |

| | | | |
|---------|---|--|---|
| Control | Estrategias de testado y eliminación selectiva en jabalí y en ciervo | Aplicación en granjas y situaciones afines, no en campo | (Che-Amat <i>et al.</i> , 2016a, 2016b) |
| Control | Vacunación con <i>M. bovis</i> inactivado: pruebas de laboratorio (múltiples especies) y ensayos de campo (jabalí) | Protección parcial en suidos, rumiantes y modelo pez cebra | (Thomas <i>et al.</i> , 2017; Díez-Delgado <i>et al.</i> , 2018; López <i>et al.</i> , 2018; Risalde <i>et al.</i> , 2018; Roy <i>et al.</i> , 2018b) |
| Control | Desarrollo de programas de bioseguridad específicos para explotaciones de bovino | Posibilidades para una gestión ganadera que considere la interacción ganado-fauna | (Martínez-Guijosa <i>et al.</i> , n.d.; Barasona <i>et al.</i> , 2013) |
| Control | Evaluación del uso de restos de caza y carnes, e impacto de las políticas de gestión de estos restos sobre la prevalencia de tuberculosis | Gestión adecuada de los residuos de caza para reducir riesgos de transmisión mediante carroñeo | (Cano-Terriza <i>et al.</i> , 2018a; Carrasco-García <i>et al.</i> , 2018) |

Objetivos inmediatos y su beneficio potencial para el control de TB.

| Campo | Objetivo | Beneficio |
|---------------|---|---|
| Diagnóstico | Transferir las nuevas herramientas de diagnóstico al sector. Pruebas de concepto y aplicación con administraciones y empresas | Facilitar la detección y el seguimiento de la TB en todas las especies relevantes, silvestres y domésticas |
| Epidemiología | Entender y modelizar el funcionamiento de las redes complejas de mantenimiento del CMT en reservorios mixtos. Evaluación de riesgos y, particularmente, cuantificación de la contribución de la fauna silvestre a la incidencia de explotación | Identificar nuevas dianas epidemiológicas para el control de TB. Posibilitar la exploración de múltiples opciones de intervención, solas o combinadas |
| Control | Desarrollar y transferir tecnologías y servicios que contribuyan a mejorar el control de la tuberculosis animal. Priorización y adecuación de las actuaciones preventivas en base a la distribución espacial del riesgo. Evaluación de programas formativos que permitan transferir tecnologías | Reducir la prevalencia de infección en hospedadores clave, tanto silvestres como domésticos |

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

Julio Álvarez

jalvarez@visavet.ucm.es

www.visavet.es

Historia

El Servicio de Micobacterias del Centro VISAVET lleva trabajando desde su concepción, hace más de 15 años, en el campo del diagnóstico bacteriológico y molecular de las infecciones producidas por bacterias pertenecientes al género *Mycobacterium*, fundamentalmente tuberculosis y paratuberculosis. Además, desde el centro se han realizado numerosos estudios centrados en la caracterización molecular y el estudio de la epidemiología de las enfermedades causadas por micobacterias. 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, así como el desarrollo de nueva tecnología para estudios de caracterización molecular. El laboratorio también diseña estudios de campo de programas de control y erradicación en situaciones problemáticas para su posterior aplicación a nivel nacional. 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 prueba de vacunas en diversas especies animales. Por último, desde el Servicio se han venido realizando además labores de asesoría a los servicios oficiales veterinarios de distintas Comunidades Autónomas, ganaderos y veterinarios, así como a Ministerios en el diagnóstico y el control de tuberculosis y paratuberculosis.

Actualidad

En los últimos años se ha potenciado el área de epidemiología cuantitativa aplicada al control y erradicación de tuberculosis mediante la colaboración con distintos servicios veterinarios oficiales en España y en otros países y, con otros centros de investigación. Así, la aplicación de diversas aproximaciones analíticas ha permitido la caracterización de 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 (TBb) en diversas áreas de Uruguay, Estados Unidos y España. Nuestros trabajos han demostrado la diferente contribución de los movimientos en el mantenimiento del ciclo de transmisión de *M. bovis* en el ganado en relación a otros factores condicionantes de la epidemiología de la TBb en distintos contextos epidemiológicos de alta, media y baja prevalencia. Del mismo modo se ha valorado, mediante distintas técnicas de análisis cuantitativo, la existencia de patrones en la distribución espacio-temporal de la TBb en áreas de alta prevalencia en España, Tailandia y Uruguay. La combinación de parte de estos métodos analíticos con modelos de transmisión intra- e inter-rebaño ha permitido además la cuantificación del rendimiento esperado de distintas alternativas para la vigilancia y el control de la TBb en explotaciones situadas en diferentes regiones del mundo.

Otra de las áreas del conocimiento desarrollada con mayor intensidad en los últimos años ha sido la de evaluación de técnicas diagnósticas para la detección de la tuberculosis en distintas especies de rumiantes domésticos mediante aproximaciones tradicionales y el uso de la estadística Bayesiana. En los diversos trabajos realizados recientemente se ha estudiado el efecto del punto de inoculación sobre la respuesta obtenida en la prueba de intradermotuberculinización en el ganado bovino, demostrándose así la existencia de una mayor probabilidad de reacción en animales infectados cuando la PPD se inocula en áreas más craneales de la región cervical. Del mismo modo el uso de técnicas de evaluación de pruebas diagnósticas en ausencia de una prueba de referencia ha permitido determinar la sensibilidad y especificidad diagnósticas de las pruebas de intradermotuberculinización, detección de interferón-gamma y detección de anticuerpos en rebaños infectados en España, Uruguay y Kuwait. Igualmente, se ha estudiado en profundidad el impacto de la coinfección de tuberculosis y paratuberculosis, de la vacunación frente a paratuberculosis o de la infección por pseudotuberculosis en el rendimiento de las pruebas diagnósticas aplicadas en rebaños de ganado bovino y caprino.

Estos trabajos se suman a otros realizados sobre vacunación, en colaboración con diversos grupos de investigación y en los que se han evaluado con éxito candidatos vacunales prometedores como el basado en la cepa modificada genéticamente *Mycobacterium tuberculosis* SO2, empleando además cabras como modelo experimental y sistemas de infección natural o experimental para evaluar la protección conferida por las vacunas, aspectos en los que el Centro VISAVET posee amplia experiencia.

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 TBb en España. Dicho objetivo general se abordará mediante la consecución de los siguientes objetivos parciales:

1. Determinación de la eficacia de las estrategias de vigilancia y diagnóstico actuales (pasivas y activas) de TBb 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.
2. Caracterización de los factores de riesgo ligados a explotaciones crónicas y recurrentes: mediante la evaluación de datos de campo en regiones de alta prevalencia se identificarán las explotaciones crónicas (infectadas durante largos periodos de tiempo) y recurrentes (infectadas periódicamente previa recuperación de su condición de libres de tuberculosis) así como los factores asociados con las mismas.
3. Determinación del papel de las micobacterias atípicas en la aparición de falsas reacciones positivas en las pruebas de diagnóstico de la TBb: 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.
4. Evaluación del papel de la fauna salvaje en el mantenimiento de la TBb 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 silvestre.
5. Evaluación de la seguridad y eficacia de candidatos vacunales experimentales frente a la tuberculosis en animales: el modelo experimental “cabra” y los sistemas de infección natural empleados previamente

servirán de base para nuevos estudios de seguridad y eficacia de vacunas candidatas a ser alternativas a la BCG o como refuerzo de la respuesta inmune (estrategia *booster*) en animales previamente vacunados con esta última. ■

Resumen

Objetivos inmediatos y su beneficio potencial para el control de TB.

| Campo | Resultado | Aplicación | Referencia |
|---------------|--|---|---|
| Epidemiología | Herramientas para la detección de agrupamiento de enfermedad en redes de movimientos | Evaluar el papel de los movimientos en la transmisión de la tuberculosis bovina | (VanderWaal <i>et al.</i> , 2016) |
| Epidemiología | Determinación de la eficacia de distintas estrategias para la vigilancia y el control de la tuberculosis bovina mediante modelización | Optimización de las actuales estrategias para la detección y el control de la tuberculosis bovina | (VanderWaal <i>et al.</i> , 2017; Kao <i>et al.</i> , 2018) |
| Epidemiología | Identificación de patrones espaciales y otros factores de riesgo en la distribución de la tuberculosis bovina | Determinación de áreas de alto riesgo de tuberculosis bovina | (de La Cruz <i>et al.</i> , 2014; Picasso <i>et al.</i> , 2017; Singhla <i>et al.</i> , 2017) |
| Vacunación | Seguridad y eficacia de la cepa vacunal M. tuberculosis SO2 en ganado caprino | Proveer datos sobre potenciales candidatos vacunales de tuberculosis para el control de la enfermedad | (Bezoes <i>et al.</i> , 2017; Roy <i>et al.</i> , 2017, 2018b)(Bezoes <i>et al.</i> , 2015b) |
| Diagnóstico | Evaluación de la fiabilidad de las técnicas disponibles para el diagnóstico de la tuberculosis bovina en distintas situaciones epidemiológicas | Estimación de la sensibilidad y especificidad de la IDTB y el test de IFN-g | (Picasso-Risso <i>et al.</i> , n.d.; Casal <i>et al.</i> , 2015; Al-Mouqatea <i>et al.</i> , 2018; de la Cruz <i>et al.</i> , 2018) |
| Diagnóstico | Evaluación de la interferencia producida por la vacunación frente a paratuberculosis y la infección por pseudotuberculosis en ganado caprino. Efecto de la cepa de micobacteria sobre el diagnóstico | Diseño de programas de control de tuberculosis en el ganado caprino | (Bezoes <i>et al.</i> , 2015a, 2015b; Roy <i>et al.</i> , 2018a) |

Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB.

| Campo | Objetivo | Beneficio |
|---------------|--|---|
| Epidemiología | Identificación de factores ligados a infecciones recurrentes/residuales | Diseño de estrategias encaminadas al control y erradicación de la tuberculosis en explotaciones de alto riesgo |
| Epidemiología | Determinación del grado de transmisión inter-especie entre fauna salvaje y doméstica en zonas de alta prevalencia en España | Caracterización del papel de la fauna salvaje en el mantenimiento de la tuberculosis bovina en el ganado en zonas endémicas |
| 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 | Establecimiento de la sensibilidad y especificidad de las estrategias usadas en la campaña de erradicación a nivel de rebaño | Determinación de la probabilidad de error al calificar rebaños como infectados/libres de tuberculosis |

Grupo de Investigación de Patología Infecciosa Veterinaria - Red de Grupos de Investigación de Recursos Faunísticos - Universidad de Extremadura

José Manuel Benítez Medina

jmbenimed@unex.es

www.recursosfaunisticos.com

0

Historia

A pesar de que no fue hasta hace apenas 10 años cuando se creó de manera oficial el grupo de investigación de Patología Infecciosa Veterinaria (PATIN), perteneciente a la Red de Grupos de Investigación de Recursos Faunísticos (GrinReF) de la Universidad de Extremadura, tenemos que retrotraernos a la última década del siglo pasado para situar los comienzos de este grupo en la investigación en tuberculosis, una enfermedad infecciosa tenaz y persistente que ha afectado a las poblaciones humanas y animales durante miles de años. Ya en los albores de nuestra particular «cruzada contra la tuberculosis» –que se ha erigido en lema de este *workshop*– revelamos la implicación de los animales salvajes en la epidemiología de la infección por *Mycobacterium bovis* (Tato, 1999), no solo en el ganado bovino sino también en otras especies de animales domésticos con los que comparten hábitat (Parra *et al.*, 2003, 2005). Precisamente el hecho de estar afincados en una región donde la producción ganadera se basa fundamentalmente en sistemas extensivos ha condicionado en gran medida nuestros trabajos (Hermoso de Mendoza *et al.*, 2006; Parra *et al.*, 2006; García-Sánchez *et al.*, 2007), al tiempo que ha generado una necesidad de apoyo científico en materia de sanidad animal a la Administración autonómica, con la que siempre hemos estado en sintonía y que en parte ha financiado muchas de nuestras investigaciones, a través de sucesivos convenios de colaboración. Esta alianza se centró en un principio en aclarar cuestiones relacionadas básicamente con la epidemiología de la enfermedad en el ganado, mediante la confirmación bacteriológica y la caracterización molecular de los aislados del «complejo *Mycobacterium tuberculosis*» procedentes de animales sacrificados en el marco de las campañas de saneamiento. Sin embargo, ante la preocupación que la tuberculosis generaba en los sectores ganadero y cinegético de nuestra región, en el año 2010 se da un paso más y se produce lo que a nuestro juicio fue un hito en este ámbito, ya que por primera vez los responsables de la Administración en materia de sanidad animal y recursos cinegéticos decidieron, bajo un enfoque integrador, buscar soluciones consensuadas a un problema compartido, y todo ello basado en la experiencia científica de nuestro grupo de investigación (Parra *et al.*, 2008; Castillo *et al.*, 2011; García-Jiménez *et al.*, 2013a). Experiencia que, por otra parte, no se ha limitado exclusivamente al estudio de la enfermedad en los animales, sino que a lo largo de nuestra historia también se han tenido presente las conexiones entre la salud pública, la medicina veterinaria y la sanidad animal, demostrando que en la actualidad sigue existiendo un fuerte vínculo entre tuberculosis animal y humana (Benítez-Medina, 2015). Por ello, defendemos abiertamente que es necesario continuar trabajando en línea con el concepto de «un mundo, una salud».

Actualidad

Y es que por increíble que parezca, todavía hay colectivos a los que hoy en día tenemos que seguir recordándoles que la tuberculosis es una zoonosis. Por ese motivo, queremos resaltar que una de nuestras principales ocupaciones en la actualidad es justamente la de combatir esa pérdida de perspectiva frente al problema de la tuberculosis en las diversas actividades de difusión en las que participamos. De hecho, para nuestro grupo, la transferencia de conocimiento no es solo una exigencia administrativa al acabar un proyecto o un apartado más de cualquier guía de buenas prácticas en investigación, sino que es una prioridad –de ahí que sea lo primero de lo que hablamos–. Tanto es así que en el actual «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» (Referencia: I24/16; nº de expediente: I653999FR020; financiado por la Consejería de Medio Ambiente y Rural, Políticas Agrarias y Territorio de la Junta de Extremadura y el FEADER) nos hemos marcado como principal objetivo convencer a los sectores afectados (ganaderos, propietarios de fincas y gestores cinegéticos comprometidos) de que con medidas complementarias de potenciación del sistema inmunitario, aplicadas a animales domésticos (Benítez-Medina *et al.*, 2018) y salvajes (Risco *et al.*, 2016, 2018), y mejoras del entorno de la dehesa (Lozano-Diéguez *et al.*, 2018), es posible el control de la tuberculosis en la caza mayor y la erradicación en el ganado. Pero como todavía nadie ha inventado hacerlo de otro modo, aunque es posible que tengamos que buscar la fórmula si continúan poniendo trabas a la generación de conocimiento científico, para poder transferir previamente ha habido que investigar.

En este sentido, la información obtenida con los primeros trabajos sobre la epidemiología de la tuberculosis en Extremadura (Tato, 1999; Parra *et al.*, 2003, 2005, 2006; Hermoso de Mendoza *et al.*, 2006), así como alguno más reciente (García-Jiménez *et al.*, 2016), nos ha servido de base para diseñar medidas aplicables en las poblaciones salvajes y domésticas (Parra *et al.*, 2008; Castillo *et al.*, 2011; García-Jiménez *et al.*, 2013b). Por su parte, una serie de estudios relacionados con la definición del estadio lesional de tuberculosis (García-Jiménez *et al.*, 2012, 2013a, 2013c) nos ha aportado el conocimiento necesario para poder realizar una estimación del riesgo epidemiológico existente en una zona determinada, y en función de ello adaptar las medidas a cada escenario. Asimismo, son varios los trabajos en los que hemos utilizado la caracterización de los patrones lesionales en las poblaciones salvajes como indicador para evaluar la gravedad de la situación, y de este modo, se ha asociado la presencia de procesos generalizados de tuberculosis a bajos niveles séricos de vitamina D en jabalí y ciervo; por lo que el aporte suplementario de vitamina D podría servir como medida de control para reducir la gravedad de la tuberculosis en estas especies (Risco *et al.*, 2016). De igual forma, la valoración del aporte suplementario de vitamina D para determinar su potencial como método complementario para el control de la tuberculosis en ganado bovino nos ha permitido observar que la suplementación alimentaria continuada, durante un mínimo de 12 semanas, con complementos vitamínico-minerales enriquecidos en vitamina D aumenta los niveles de esta sustancia de forma significativa, lo cual podría servir como una medida complementaria para controlar la tuberculosis también en ganado bovino (Benítez-Medina *et al.*, 2018).

Figura 1. La suplementación alimentaria con complementos vitamínico-minerales enriquecidos en vitamina D podría servir como una medida complementaria para controlar la tuberculosis en ganado bovino.



Otra de nuestras líneas de investigación actuales vuelve a tener al jabalí como protagonista, ya que lo consideramos un buen modelo biológico para el estudio de enfermedades concomitantes. Así, los estudios en los que hemos investigado la influencia de la infección por agentes patógenos como el circovirus porcino tipo 2 (Risco *et al.*, 2013, 2014), el virus de la enfermedad de Aujeszky y parásitos como *Metastrongylus* spp. (Risco *et al.*, 2014) han revelado que la concomitancia de procesos patológicos puede agravar la enfermedad en el jabalí y provocar un aumento de la prevalencia de tuberculosis. También hemos valorado el efecto de medidas sanitarias encaminadas al control de estos agentes inmunosupresores, como la vacunación de jabalíes frente al circovirus porcino tipo 2 que parece tener un efecto positivo al reducir la probabilidad de desarrollar tuberculosis generalizada (Risco *et al.*, 2018). Estos trabajos previos, constituyen la base de otro de los proyectos que estamos desarrollando actualmente para confirmar estos hallazgos y que se titula: «Influencia de enfermedades concomitantes en el desarrollo de la tuberculosis en el jabalí: propuesta de medidas de lucha» (Referencia: IBI6079). El control de agentes inmunosupresores mediante vacunaciones y desparasitaciones persigue, de igual forma que las mejoras nutricionales, reforzar el sistema inmunitario de los animales. Con ello, se pretende aumentar la resistencia natural frente a la infección, y en el caso del ganado, potenciar su reactividad a las pruebas diagnósticas oficiales.

Además de este conjunto de medidas destinadas a mejorar la inmunidad, también estamos estudiando funcional y económicamente medidas de bioseguridad en explotaciones de ganado bovino de carne en extensivo, predominantes en Extremadura. Así pues, a través del grupo operativo autonómico INNOTUBEX, estamos colaborando con entidades del sector ganadero y del cinegético en el desarrollo del proyecto: «Técnicas innovadoras para el control integral de la tuberculosis en los ecosistemas extensivos». El objetivo principal que se persigue es mejorar el aprovechamiento animal en las fincas extensivas de nuestra región de forma armónica y mínimamente lesiva para el entorno natural, logrando un control integral de la enfermedad. Además, teniendo en cuenta que existen determinados puntos de especial trascendencia en el contagio de la tuberculosis, pretendemos demostrar la eficacia de diferentes medidas de bioseguridad encaminadas a evitar que la fauna cinegética y el ganado doméstico compartan agua y alimentos, y con ello lograr la reducción de los contagios, y, por ende, de las prevalencias de la enfermedad.

Futuro

Los diferentes proyectos que tenemos en marcha nos estimulan a seguir ahondando durante los próximos años en el estudio de la tuberculosis en la interfaz entre ganado doméstico, fauna salvaje y medio ambiente. De hecho, la evaluación del entorno de la dehesa será una de las líneas en las que continuaremos profundizando en el futuro para mejorar nuestros conocimientos sobre el funcionamiento del ecosistema y su influencia en el estatus sanitario de las poblaciones. En este campo, nuestra hipótesis de trabajo es que una gestión eficaz de los recursos forrajeros, con medidas como la planificación del pastoreo, puede contribuir a reducir la tuberculosis. De igual forma, seguiremos desarrollando el potencial de la alimentación suplementaria y del control de enfermedades concomitantes como medidas complementarias para aumentar la resistencia natural a la tuberculosis en animales domésticos y salvajes, con lo que se reduciría la transmisión de la enfermedad, al tiempo que aumentaría la sensibilidad de las pruebas diagnósticas oficiales y mejoraría la eficacia de las campañas de saneamiento ganadero. Asimismo, intentaremos aportar mejoras al diagnóstico de la enfermedad, ya que, aparte de ser una demanda de los sectores afectados, es básico para conseguir la erradicación de la tuberculosis. En concreto, procederemos a la búsqueda de nuevos «biomarcadores» para mejorar nuestra comprensión sobre la interacción entre el huésped y el agente patógeno. Para ello, pretendemos realizar un experimento *in vitro* encaminado a desvelar la respuesta de los cultivos primarios de macrófagos alveolares y macrófagos procedentes de la diferenciación de las células mononucleares de sangre periférica en especies, como la caprina y la ovina, que muestran una clara diferencia en cuanto a resistencia o susceptibilidad a la tuberculosis. Así, se inocularán experimentalmente con *Mycobacterium bovis* BCG (cepa vacunal) macrófagos procedentes de cada una de esas especies y se realizarán estudios de expresión genética de las citoquinas empleando la retro-reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, y también se analizará el proteoma mediante electroforesis bidimensional y espectrometría de masas. Y si al inicio del apartado anterior comenzábamos hablando de transferencia de conocimiento, para concluir, debemos inexorablemente volver a ella, ya que seguir informando a los agentes implicados, así como formar en esta materia a los veterinarios es otra de nuestras líneas de trabajo para el futuro. ■

Figura 2. El estudio de la tuberculosis en la interfaz entre ganado doméstico, fauna salvaje y medio ambiente seguirá siendo una de nuestras principales líneas de investigación en el futuro.



Resumen

Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB.

| Campo | Resultado | Aplicación | Referencia |
|---------------|---|---|---|
| Epidemiología | La TB es una enfermedad con multitud de hospedadores, siendo el jabalí el principal reservorio salvaje en Extremadura | Identificación de riesgos epidemiológicos y diseño de medidas aplicables en las poblaciones salvajes y domésticas | (Tato, 1999; Parra <i>et al.</i> , 2003, 2005, 2006; Hermoso de Mendoza <i>et al.</i> , 2006; García-Jiménez <i>et al.</i> , 2016)) |
| Diagnóstico | Definición del estadio lesional de TB en jabalíes y ciervos | Definición del estadio lesional de TB para realizar una estimación del riesgo epidemiológico existente en una zona determinada, y en función de ello adaptar las medidas a cada escenario | (García-Jiménez <i>et al.</i> , 2012, 2013a, 2013c) |
| Control | Reducción de prevalencias de TB por dispersión del alimento suplementado | Ayuda al control de la TB salvaje reduciendo los riesgos de contagio | (Castillo <i>et al.</i> , 2011) |
| Control | Reducción drástica de las poblaciones de jabalí | Medida que ayuda a reducir riesgos de contagio entre las poblaciones simpátricas, aunque no basta por sí sola | (García-Jiménez <i>et al.</i> , 2013b) |
| Control | La concomitancia de procesos patológicos puede agravar la enfermedad en el jabalí y provocar un aumento de la prevalencia de TB | El control de agentes inmunosupresores refuerza el sistema inmunitario de los animales y permite aumentar la resistencia natural frente a la infección | (Risco <i>et al.</i> , 2013, 2014, 2018) |
| Control | Mayor TB generalizada asociada a bajos niveles séricos de vitamina D en ciervo y jabalí | Medida complementaria para aumentar la resistencia innata a la infección de las poblaciones salvajes | (Risco <i>et al.</i> , 2016) |
| Control | Aumento significativo del nivel de vitamina D en ganado bovino tras recibir alimentación suplementaria | Medida complementaria para reforzar el sistema inmunitario de los animales y aumentar la eficacia del saneamiento ganadero | (Benítez-Medina <i>et al.</i> , 2018) |

Objetivos inmediatos y su beneficio potencial para el control de TB.

| Campo | Objetivo | Beneficio |
|---------------|---|--|
| Epidemiología | Estudio de la tuberculosis en la interfaz entre ganado doméstico, fauna salvaje y medio ambiente | Conocer la importancia epidemiológica de algunas especies e identificar nuevos reservorios |
| Control | Estudio del potencial de la alimentación suplementaria | Ayudar al control de la TB en especies domésticas y ganaderas |
| Control | Reforzar el sistema inmunitario de los animales mediante el control de enfermedades concomitantes | Mejorar la resistencia a la infección y mejorar el diagnóstico de tuberculosis |
| Control | Demostrar la eficacia de diferentes medidas de bioseguridad encaminadas a evitar que la fauna cinegética y el ganado doméstico compartan agua y alimentos | Reducir los contagios, y, por ende, las prevalencias de la enfermedad |
| Diagnóstico | Búsqueda de nuevos «biomarcadores» para mejorar nuestra comprensión sobre la interacción entre el huésped y el agente patógeno | Mejorar las técnicas diagnósticas, así como el posible desarrollo de nuevas vacunas frente a la TB |

CONCLUSIONES

Por el comité científico:

Javier Hermoso de Mendoza
Remigio Martínez
José Manuel Benítez
Ana Balseiro

Moderadores y secretarios de mesas redondas:

Fernando Boinas
Ana Botelho
César Fernández
Olga Mínguez
José Carlos Moreno
Marta Muñoz
Beatriz Romero
Marta Vigo

El objetivo fundamental en este *Workshop*, siguiendo el modelo iniciado en Gijón en 2015, ha sido poner en contacto entre sí a los diferentes grupos de investigación que trabajan en tuberculosis animal en España y Portugal, así como con representantes de la Administración española y portuguesa con competencias en sanidad animal.

En la primera jornada de trabajo se presentaron y actualizaron las actividades de los distintos grupos, que son muy diversas y que cubren una amplia variedad de aspectos relacionados con este tema. Al día siguiente, se comenzó con sendas ponencias de los representantes de los ministerios de agricultura español y portugués, en las que abordaron los puntos claves sobre la lucha contra la tuberculosis animal en el ámbito ibérico y las perspectivas que se abren ante la nueva legislación europea de sanidad animal. A continuación, se procedió a discutir, en varias mesas redondas simultáneas, cuáles son las necesidades o carencias que se plantean en el momento actual en la lucha contra la tuberculosis animal de forma general, pero también a escala de explotación/finca en cuanto a análisis de riesgos y medidas preventivas, a diagnóstico de campo y laboratorio, a medidas de control, en relación con actuaciones oficiales, a información y concienciación de los sectores afectados, etc. Tras un intenso análisis de las diversas materias planteadas en cada una de las mesas redondas, se establecieron diferentes conclusiones.

Esas ideas y “**resoluciones**” quedan recogidas en este apartado, y han de servir como marco de referencia para las futuras investigaciones en tuberculosis animal que permitan mejorar la situación actual y alcanzar el objetivo de erradicación en la ganadería al que todos los presentes en el *Workshop* aspiramos. Para seguir un orden lógico en la relación de las conclusiones, se han ordenado siguiendo la secuencia de prevención, diagnóstico, investigación de brote, factores que pueden resultar críticos en la lucha contra la tuberculosis, etc.

1. PREVENCIÓN

1.1 Contención

En este sentido, y dado que ya está demostrada científicamente la necesidad de establecer medidas de bioseguridad para controlar las infecciones tuberculosas de origen medioambiental, limitando los riesgos de transmisión de la enfermedad, se ha propuesto usar diversos sistemas de contención y separación de especies y de control del acceso de los animales a alimentos y agua.

Para ello, “es importante **desarrollar experimentalmente nuevas medidas de bioseguridad y mejorar las existentes**. Asimismo, es preciso que se **diseñen protocolos de bioseguridad que puedan ponerse a disposición de los diferentes sectores afectados** (ganaderos y gestores cinegéticos) y que puedan asociarse a procedimientos normalizados de trabajo por parte de las autoridades en materia de sanidad animal. Paralelamente, sería preciso **describir métodos específicos de base científica para la evaluación y el seguimiento de la eficacia de los protocolos de bioseguridad**”.

1.2. Auditorías de bioseguridad

En línea con lo anterior, las auditorías de bioseguridad han demostrado ser herramientas necesarias para la toma de decisiones para el control de la tuberculosis, tanto en fincas de producción ganadera, como en fincas cinegéticas y de aprovechamiento mixto. Estas auditorías han de ser integrales, incluyendo a todas las especies que conviven en una misma finca. De estas revisiones sistemáticas puede extraerse ingente volumen de información útil para las propias campañas de saneamiento.

A pesar de que en la normativa sanitaria ya están descritas algunas modalidades de estas auditorías, “las evaluaciones que se realizan en fincas localizadas en áreas de alta incidencia de tuberculosis requieren cierta simplificación, sin perder por ello validez científica ni utilidad de campo. Sería práctico, por tanto, **modificar las evaluaciones para que tuvieran formato de listas de chequeo**, con las que fuera fácil identificar los puntos de riesgo y sirvieran de referencia para sugerir medidas de bioseguridad útiles a escala de unidad productiva (explotación/coto). También es conveniente que, una vez realizadas un número significativo de auditorías, puedan utilizarse sus resultados para **evaluar su utilidad e impacto mediante análisis estadísticos, relacionando los datos obtenidos con la ubicación geográfica y el nivel de riesgo asignado a cada finca**”.

1.3. Manejo alimentario

Entre las medidas de bioseguridad más polémicas destacan las que se refieren al manejo alimentario de especies cinegéticas.

En **fincas cerradas**, al igual que debe hacerse con las especies ganaderas, está aceptado que la alimentación suplementaria que se aporte a la caza mayor debe ser de calidad y composición equilibrada, que compense las carencias de la alimentación natural. De este modo es posible alcanzar y mantener unas condiciones corporales adecuadas que ayuden a mejorar la respuesta inmunitaria de los animales frente a la tuberculosis y otras enfermedades infecciosas o parasitarias. Este suministro siempre deberá ser acorde a la carga animal presente en la finca, al control sanitario de las especies contenidas en su interior y a la preservación de la cubierta vegetal natural del entorno.

Sin embargo, existe amplio acuerdo sobre la necesidad de limitar el aporte de alimentos a la fauna silvestre en **fincas abiertas**, aunque se admiten situaciones excepcionales en las que puede estar justificado el suministro de alimentos para el cebado de áreas concretas, siempre que con su uso se consigan cupos importantes de capturas, que compensen sobradamente los riesgos potenciales que estas prácticas suponen para el contagio de tuberculosis en animales.

En relación con estas prácticas, “la investigación científica debe **definir con claridad cuáles son las situaciones excepcionales en las que el cebado en áreas abiertas de caza mayor con alta prevalencia de tuberculosis es admisible**, cómo estimar los beneficios esperables, qué tipos de alimentos pueden utilizarse, cómo, dónde y cuándo han de suministrarse y cómo han de auditarse los efectos reales de su aplicación”.

1.4. Inmunosupresión

Por su parte, existen estudios científicos que demuestran la relación entre la abundancia y gravedad de la tuberculosis y los estados de inmunosupresión en especies cinegéticas y ganado, debidos a la malnutrición y a co-infecciones de carácter inmunosupresor. Igualmente, se ha constatado experimentalmente el efecto positivo que tiene para el control de la enfermedad contrarrestar esos estados de inmunosupresión con medidas adecuadas.

Por ello, “resulta conveniente seguir investigando las causas y efectos de las situaciones de inmunosupresión para poder **diseñar protocolos nutricionales y sanitarios específicos a fin de potenciar la respuesta inmunitaria** de los animales a las infecciones por el Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTB), que puedan ser utilizados por los sectores afectados, lo que ayudaría a reducir los riesgos de contagio, mantenimiento y dispersión de la enfermedad”.

A su vez, “es importante también que el diseño de dichos protocolos permita a las autoridades competentes en materia de sanidad animal **poder evaluar de forma normalizada los costes y beneficios de su aplicación**”.

De igual forma, “se debe aumentar el conocimiento científico existente sobre **nuevos sistemas de inmunomodulación** en la lucha contra la tuberculosis animal, diferentes a los asociados al uso de vacunas, como pueden ser los de base nutricional, de especial interés para usar tanto en animales de renta como en especies cinegéticas de fincas cerradas”.

1.5. Vacunas

Las vacunas contra la tuberculosis siguen siendo herramientas a considerar para el control de la tuberculosis en especies cinegéticas. Los estudios realizados con jabalíes prueban que la vacuna ayuda a controlar la tuberculosis en súidos en determinadas circunstancias epidemiológicas.

Dada la complejidad de los procedimientos de autorización para registro de nuevas vacunas de tipo convencional, se contempla la posibilidad de desarrollar autovacunas para usar en jabalíes de las fincas afectadas. No obstante, “para llegar a un uso práctico de autovacunas para el control de la tuberculosis en jabalíes es preciso **definir experimentalmente procedimientos estandarizados** de inactivación de las cepas, de purificación de preparados vacunales, la adición de coadyuvantes, las pruebas de inocuidad, la dosificación y el protocolo de uso”.

Además, “aún hay margen para el **desarrollo experimental de nuevos preparados de antígenos** potencialmente eficaces contra la tuberculosis en especies salvajes diferentes al jabalí”.

Igualmente, “es preciso **investigar sobre los tiempos de respuesta** a esos preparados experimentales y **sobre la duración de su inmunidad**”.

1.6. Percepción de los sectores y opinión pública

Por otro lado, la experiencia práctica, los conocimientos y la opinión de ganaderos, de personas vinculadas al mundo cinegético, e incluso de habitantes de áreas urbanas y periurbanas relacionados con ganadería y caza, son un capital todavía poco aprovechado para el diseño y aplicación de medidas de bioseguridad y para valorar el impacto social y las probabilidades de éxito de las nuevas medidas de control. Tener en cuenta sus opiniones sobre las medidas de bioseguridad existentes y antes de instaurar otras nuevas puede mejorar significativamente la apreciación que los sectores afectados tengan sobre las mismas.

En este sentido, “los estudios de estadística sociológica son herramientas que pueden resultar muy útiles para analizar la percepción que se tiene sobre las medidas de bioseguridad que se proponen y sobre sus efectos, para ello es necesario el diseño y la realización de encuestas/entrevistas detalladas con representantes de los agentes y sectores sociales afectados”.

2. DIAGNÓSTICO

2.1. Tuberculinas

En el ganado bovino, la intradermotuberculinización (IDTB), basada en PPD, es actualmente la técnica recogida en la normativa para la calificación de las explotaciones. Existe evidencia experimental de posibles reacciones cruzadas con bacterias filogenéticamente próximas (micobacterias atípicas, corinebacterias y otras) que poseen ciertos componentes antigénicos homólogos a los presentes en la tuberculina.

De ahí que “para mejorar el diagnóstico de campo es preciso experimentar y evaluar otros antígenos que se puedan integrar en nuevas tuberculinas sintéticas, de modo que no disminuya la sensibilidad de la prueba intradérmica y se puedan reducir los problemas de especificidad”.

2.2. IDTB en caprinos

Por su parte, en el ganado caprino, que en algunas comunidades autónomas españolas está siendo objeto de campañas oficiales de erradicación con buenos resultados, existe mayor conocimiento técnico y experiencia sobre el diagnóstico de tuberculosis que en el resto de especies de interés económico.

Sin embargo, “la sensibilidad y especificidad de las pruebas oficiales sobre la especie caprina aún requieren estudios científicos que permitan mejorar el conocimiento existente, con especial interés en definir el lugar óptimo de inoculación para la prueba IDTB y seleccionar el tipo de prueba a utilizar según la situación epidemiológica.”.

2.3. IDTB en otros rumiantes

En cuanto a otras especies rumiantes de interés económico como ovinos, camélidos y cérvidos, la IDTB es un requerimiento para el movimiento de estos animales en un contexto de programa oficial de erradicación y para cualquier transacción comercial nacional o internacional. Aunque se parte de la experiencia y los protocolos aplicados en el ganado bovino, es obvio que hay diferencias entre especies que pueden influir en la interpretación válida de los resultados. Así, de forma general se considera que en estas otras especies la especificidad de la IDTB basada en PPD, es baja.

Por ello, “es necesario conocer y evaluar experimentalmente qué factores afectan al diagnóstico de tuberculosis mediante la prueba intradérmica en especies de interés económico distintas del bovino y caprino, así como evaluar la sensibilidad y especificidad de antígenos alternativos. Se requiere, además, crear protocolos estandarizados de uso y aportar formación a los veterinarios en la realización de IDTB en las especies comentadas”.

2.4. Interferón gamma

Para garantizar el estatus de libre de tuberculosis y el movimiento de animales, la nueva legislación sobre sanidad animal contempla en bovinos el uso de la prueba de interferón gamma (IFN γ), estimulando las muestras de sangre con PPD.

A pesar de que en este momento hay ya definido uno, “existe la necesidad de establecer unos protocolos estandarizados de ámbito europeo que incluyan los distintos kits disponibles en la actualidad para el diagnóstico de tuberculosis mediante IFN γ ”.

Además, “el Laboratorio Europeo de Referencia de Tuberculosis necesita la colaboración de los Laboratorios Nacionales de Referencia y de los Laboratorios Regionales para garantizar el desarrollo de esos protocolos estandarizados con validez en el ámbito europeo”. Para ello, “es preciso evaluar experimentalmente distintos parámetros, siendo crítico el tiempo de estimulación y el punto de corte para la identificación de positivos, entre otros. En lo que se refiere al tiempo de estimulación, sería necesario que las empresas del sector investiguen la posibilidad de iniciar la estimulación directamente en el campo, evaluándose el coste y el tiempo de trabajo que estos cambios en el protocolo pueden implicar”.

A su vez, para estandarizar estos protocolos se considera fundamental el empleo de una tuberculina para la estimulación de las sangres de un único fabricante. Por ello, “es preciso especificar las características óptimas que ha de tener la tuberculina que se emplee como agente estimulante único en el diagnóstico de tuberculosis por kits de detección de IFN γ . Los fabricantes de estos kits deberían estandarizar en sus laboratorios la interpretación de los resultados con dicha tuberculina de referencia”.

De igual forma, en el ganado caprino también “es necesario definir el punto de corte para la identificación de positivos con la prueba de IFN γ , calcular el rendimiento de la prueba de IFN γ , etc.”.

2.5. Diagnóstico serológico

La investigación sobre el uso de serología en el diagnóstico de tuberculosis en bovino, aunque aún debe seguirse desarrollando ha demostrado que puede aportar una información adicional a las pruebas diagnósticas oficiales basadas en inmunidad celular, ya que con su uso se cubren las distintas etapas de la infección y ayuda a identificar animales que sean anérgicos (animales infectados no reaccionantes). Asimismo, está demostrada experimentalmente la conveniencia de usar la IDTB antes de hacer un estudio serológico para aumentar la sensibilidad, por el efecto potenciador de la sensibilidad (*booster*) que crea la IDTB.

De igual forma, la serología en caprino puede ser una herramienta complementaria o incluso sustitutiva de las pruebas actualmente oficiales, si en el futuro existe programa de erradicación. Sin embargo, para su uso como tal, “es necesario estudiar en caprino la utilidad potencial de la serología como método diagnóstico, para lo cual se precisa valorar en el campo cuestiones como: la utilidad que puede tener para el diagnóstico serológico el efecto booster de la tuberculinización previa; el uso de técnicas homólogas para detección de anticuerpos en muestras de tanque de leche; o el efecto en la especificidad que pueden tener algunos factores, como por ejemplo la posibilidad de reacciones cruzadas por vacunación de paratuberculosis o por infección de otras micobacterias”.

En cuanto a la serología en otras especies rumiantes como ovinos, camélidos y cérvidos, se ha comprobado que la sensibilidad es alta pero la especificidad debe mejorar. Por tanto, “en especies de interés económico diferentes al bovino y al caprino, conviene realizar estudios experimentales para mejorar la especificidad de las pruebas serológicas para el diagnóstico de tuberculosis. Asimismo, es necesario realizar más estudios experimentales de campo para evaluar el efecto que tiene sobre la especificidad de las pruebas serológicas la exposición a otras micobacterias (por vacunación de paratuberculosis o por infecciones)”.

2.6. Diagnóstico molecular

Actualmente, la PCR directa se usa en el diagnóstico de tuberculosis animal como técnica complementaria al cultivo microbiológico, habiéndose demostrado científicamente que la sensibilidad y especificidad

de la técnica respecto al cultivo es muy buena. Sin embargo, no hay un protocolo estandarizado y eso puede afectar a los resultados.

Por tanto, “se necesita **optimizar y estandarizar en el laboratorio los protocolos para diagnóstico de tuberculosis por PCR sobre ADN total** extraído directamente de tejidos de animales positivos a pruebas oficiales de diagnóstico”.

3. INVESTIGACIONES EPIDEMIOLÓGICAS DE BROTE

3.1. Encuestas epidemiológicas

La experiencia está demostrando que no es fácil realizar adecuadamente encuestas con las que poder extraer suficientes resultados útiles para ayudar al control de brotes en campo. Por ello, “conviene **impartir formación reglada específica a los veterinarios** encargados de efectuarlas, creando equipos que puedan realizar eficazmente las encuestas epidemiológicas en brotes de tuberculosis y sean capaces de analizar de forma estandarizada los resultados obtenidos en dichas encuestas”.

3.2. Epidemiología molecular

Por otra parte, la bibliografía científica y la experiencia de muchos grupos de investigación confirman la utilidad de la epidemiología molecular en el contexto de investigaciones de brotes. En relación con este ámbito, “las encuestas epidemiológicas de brotes de tuberculosis deberían **incluir un apartado específico para recomendar o no, en función del historial epidemiológico de la explotación, la caracterización molecular de los agentes aislados en un nuevo brote**”.

Al mismo tiempo, para mejorar su posible utilidad práctica desde la Administración, “es necesario desarrollar **protocolos estandarizados para analizar la información** de los resultados de epidemiología molecular”.

No cabe duda de que la epidemiología molecular constituye una herramienta inigualable para una valoración objetiva del posible origen de un brote y para clarificar el grado de transmisión intraespecie e interespecie en determinadas zonas. Por esta razón, “la objetividad que aporta la investigación epidemiológica molecular debe aprovecharse para **informar al ganadero del potencial origen y las posibilidades de transmisión**, ayudando así a reforzar una percepción más positiva del sector sobre el programa de erradicación”.

Asimismo, desde hace años se ha demostrado que la epidemiología molecular puede servir para conocer la posible presencia y persistencia del CMTB en el entorno de los animales de las fincas y explotaciones. Sin embargo, la utilidad de las investigaciones sobre los riesgos de contagio desde el entorno se puede ver muy limitada por la calidad de los muestreos. Por ello, “para poder definir la presencia y persistencia de bacterias del CMTB en las explotaciones es necesario disponer de **protocolos estandarizados de muestreo ambiental**”.

A pesar de la abundante información que existe ya en las bases de datos nacionales e internacionales sobre los genotipos del CMTB involucrados en brotes animales y humanos, es posible que no se le esté dando toda la utilidad que se podría en la investigación epidemiológica y en las propuestas de control. Para hacerla más accesible y práctica, “la información epidemiológica molecular sobre el CMTB ya disponible en las bases de datos debería organizarse de forma consensuada, **categorizando los genotipos en función de su frecuencia y distribución**”.

Por otro lado, ya existe considerable evidencia científica de la utilidad de la secuenciación masiva como alternativa a la caracterización molecular convencional por *spoligotyping* y MIRU-VNTR. Sin embargo, aún

se trata de una tecnología relativamente reciente para esta finalidad y comparativamente cara, por lo que “es preciso seguir experimentando y optimizando las técnicas moleculares, en especial la secuenciación masiva de CMTB, y desarrollar protocolos estandarizados para el análisis de sus resultados con el objetivo de identificar el origen del foco y caracterizar la transmisión dentro del rebaño”.

3.3. Calificaciones sanitarias

En otro orden de cosas, el sistema de calificaciones sanitarias de las explotaciones ganaderas es una herramienta fundamental de gestión y seguimiento dentro de los programas de erradicación. Sin embargo, podría optimizarse su utilidad. Para ello, “es conveniente una **evaluación armonizada del impacto que tiene la gestión de calificaciones sanitarias de tuberculosis**. Para mejorar sus resultados, sería importante **integrar sistemáticamente la información epidemiológica** existente de cada explotación a fin de reducir los riesgos de difusión”.

3.4 Evaluaciones de costes y beneficios de propuestas de control

Asimismo, una evaluación de la relación entre costes y beneficios de las medidas que se proponen después de cada investigación epidemiológica de brote para reducir los riesgos de difusión de la enfermedad sería una estrategia adecuada para concienciar y motivar a los sectores afectados a su aplicación. Es posible realizar estimaciones de relación de costes y beneficios mucho más ajustadas para nuevas fincas con datos reales de explotaciones que ya lleven un tiempo aplicando tales medidas.

Por tanto, “si queremos concienciar y motivar al sector ganadero en la aplicación de las medidas que se propongan para reducir el riesgo de difusión de la enfermedad después de cada investigación epidemiológica, es necesario realizar **evaluaciones realistas de la relación coste beneficio de estas**”.

4. FACTORES QUE PUEDEN RESULTAR CRÍTICOS PARA EL CONTROL DE LA TUBERCULOSIS

4.1. Interacción con otras especies domésticas

A pesar de no haberse mencionado hasta este apartado, está ya ampliamente documentada la frecuente infección tuberculosa del porcino en extensivo, así como la utilidad de la serología como prueba de cribado para identificar explotaciones y animales positivos. Para lograr una mejor comprensión del problema y llegar a una estrategia realista de control aún queda bastante trabajo de investigación epidemiológica que realizar, para la cual, dado que la tuberculosis es habitualmente un hallazgo de matadero, resulta imprescindible optimizar los mecanismos de intercomunicación entre servicios de salud pública (inspección en mataderos) y servicios de sanidad animal.

Por tanto, “para establecer medidas adecuadas de prevención y control de la tuberculosis en explotaciones porcinas, es necesario seguir investigando para **mejorar el conocimiento de la situación epidemiológica real**. También resulta imprescindible que desde la administración se **optimicen y simplifiquen los procedimientos de recogida de información *post mortem*** de la tuberculosis en porcino, como herramienta básica de vigilancia epidemiológica pasiva, que debe complementarse con **sistemas de vigilancia activa empleando las pruebas serológicas vigentes**, e investigando mejoras de éstas o nuevos procedimientos”.

4.2. Fraudes

Los fraudes diagnósticos son una realidad reconocida desde antaño en las campañas de saneamiento ganadero. Desde procedimientos como cambiar la identificación de los animales hasta inyectar corticoides vía parenteral o aplicarlos tópicamente con cremas en la zona de tuberculización, hay una variedad no

completamente catalogada de sistemas para burlar a la Administración, a la inmunidad celular o a ambas. Iniciar un procedimiento de investigación por fraude es delicado, dado que en principio cualquier sospecha de este tipo genera situaciones realmente incómodas ante ganaderos y sus veterinarios.

Por tanto, “es imprescindible **elaborar una base de datos con un registro histórico de fraudes diagnósticos** que permitan definir cuáles son los problemas más habituales y cuáles pueden ser los indicadores de sospecha. También es necesario **diseñar un protocolo de actuación normalizado ante la sospecha de fraudes diagnósticos**”.

4.3. Seguimiento de equipos de campo

Aunque se ha avanzado mucho en la mejora de la fiabilidad y del rendimiento del diagnóstico en campañas con los cursos de homologación de la prueba intradérmica para los veterinarios de los equipos de campo, y con los procedimientos de seguimiento e inspección de su actividad, aún queda margen de mejora. Para ello, “es conveniente que en el **protocolo de inspección de los equipos de campo se añada el análisis estadístico de los datos de diagnóstico de campo obtenidos por los mismos**”.

4.4. Inspección *post mortem*

La actividad de los veterinarios en campaña también se relaciona con la recogida de muestras *post mortem* en mataderos, que permite el estudio de epidemiología molecular sobre los asilados del CMTB involucrados en los brotes.

En este sentido, “es necesario **impartir formación reglada en inspección de canales y caracterización de lesiones sospechosas para los veterinarios de los programas de erradicación de tuberculosis que recojen muestras *post mortem* en mataderos**. También deben crearse **herramientas (bancos de imagen, expertos asesores externos *on-line*, etc.)**, de utilidad potencial tanto en el contexto de los programas como en la inspección rutinaria de salud pública, que permitan un diagnóstico diferencial rápido en matadero, cuando el aspecto, morfología o localización de las lesiones sean atípicas, de forma que se disminuya el tiempo de inmovilización de la explotación y aumente la fiabilidad diagnóstica”.

4.5. Mejora de la imagen de los programas

Por último, hubo una conclusión común a todas las mesas redondas, al quedar patente la necesidad urgente de que todas las actuaciones oficiales y todos los procedimientos que se siguen en los programas de erradicación se expliquen y justifiquen adecuadamente a los propios técnicos que las ejecutan, a los sectores afectados y a la opinión pública interesada. La experiencia existente por los cursos de formación para veterinarios de los programas y también sobre los sectores, por parte de diversos grupos de investigación y administraciones, confirma la utilidad de estas estrategias como una vía óptima para asegurar una mejor aceptación y colaboración por parte de todos. Alcanzar este estatus puede ser un punto de partida para identificar actitudes positivas que puedan generar sinergias hacia el objetivo de erradicación.

En este sentido, “es urgente **optimizar la forma de informar, motivar y prestigiar la actuación de los diferentes actores implicados en el programa** ante los propios técnicos que ejecutan los programas, ante los sectores afectados y ante la opinión pública, para lo cual debe recurrirse a la **utilización de estrategias de comunicación y formación** ya aplicadas y contrastadas en otros ámbitos, como sociología, educación, etc.”.

BIBLIOGRAFÍA

Abrantes, A.C., 2017. Avaliação integrada de tuberculose em caça maior e bovinos. Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Abrantes, A.C., Acevedo, P., Serejo, J., Vieira-Pinto, M., 2018. Identificação e avaliação de fatores de risco associados à transmissão de *M. bovis* em Zonas de Caça Turísticas da região sudeste do Centro de Portugal, in: VII Reunión de Ungulados Silvestres Ibéricos. Granada, Spain, p. 33.

Abrantes, A.C., Acevedo, P., Vicente, J., Mertinez-Guijosa, A., Serejo, J., Vieira-Pinto, M., 2017. A case study –wildlife risk mitigation programs for bovine tuberculosis, in: Xth International Symposium on Wildlife. Vila Real, Portugal, p. 109. <https://doi.org/978-704-245-4>.

Acevedo-Whitehouse, K., Vicente, J., Gortázar, C., Hofle, U., Fernández-de-Mera, I.G., Amos, W., 2005. Genetic resistance to bovine tuberculosis in the Iberian wild boar. *Molecular Ecology*. 14 (10): 3209–3217. <https://doi.org/MEC2656> [pii] 10.1111/j.1365-294X.2005.02656.x.

Acevedo, P., González-Quirós, P., Prieto, J.M., Etherington, T.R., Gortázar, C., Balseiro, A., 2014. Generalizing and transferring spatial models: A case study to predict Eurasian badger abundance in Atlantic Spain. *Ecological Modelling*. 275 : 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2013.12.011>.

Acevedo, P., Ruiz-Fons, F., Vicente, J., Reyes-García, A.R., Alzaga, V., Gortázar, C., 2008. Estimating red deer abundance in a wide range of management situations in Mediterranean habitats. *Journal of Zoology*. 276 (1): 37–47. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2008.00464.x>.

Adams, D., 1982. *Life, the Universe and Everything*. Pan Books, London, U.K.

Ahlers, H., 2013. Untersuchungen zum Eintritt in die Geschlechtsreife beim männlichen europäischen Wildschwein (*Sus scrofa* L.). Georg-August-Universität zu Göttingen Göttingen.

Al-Mouqatea, S., Alkhamis, M., Akbar, B., Ali, A., Al-Aqeel, H., Bin-Heji, A., Razzaque, M., Álvarez, J., Pérez, A., 2018. Bayesian estimation of ELISA and gamma interferon test accuracy for the detection of bovine tuberculosis in caudal fold test–negative dairy cattle in Kuwait. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 30 (3): 468–470. <https://doi.org/10.1177/1040638718759574>.

Alberto, J., 2009. Study of bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in large game hunted in Idanha-a-Nova county. Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Alberto, J., Aranha, J., Serejo, J., Vieira-Pinto, M., 2011. The use of GIS in the study of tuberculosis distribution in wild boars and red deers in Central Portugal. Section 2, Epidemiology, in: Paulsen, P., Bauer, A., Vodnansky, M., Winkelmayr, R., Smulders, F.J.M. (Eds.), *Game Meat Hygiene in Focus. Microbiology, Epidemiology, Risk Analysis and Quality Assurance*. Wageningen Academic Publishers, pp. 199 – 205.

Amado, A., Albuquerque, T., Gonçalves, A., Duarte, E., Botelho, A., Fernandes, T., Bernardino, R., Lapão, N., 2006. Tuberculosis in mandrills at the Lisbon zoo. *Veterinary Record*. 159 (19): 643. <https://doi.org/10.1136/vr.159.19.643>.

- Ameni, G., Tafess, K., Zewde, A., Eguale, T., Tilahun, M., Hailu, T., Sirak, A., Salguero, F.J., Berg, S., Aseffa, A., Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M., 2018. Vaccination of calves with *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette–Guerin reduces the frequency and severity of lesions of bovine tuberculosis under a natural transmission setting in Ethiopia. *Transboundary and Emerging Diseases*. 65 (1): 96–104. <https://doi.org/10.1111/tbed.12618>.
- Ameni, G., Vordermeier, M., Aseffa, A., Young, D.B., Hewinson, R.G., 2010. Field evaluation of the efficacy of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette–Guérin against bovine tuberculosis in neonatal calves in Ethiopia. *Clinical and Vaccine Immunology*. 17 (10): 1533–1538. <https://doi.org/10.1128/CVI.00222-10>.
- Arenas, A., Borge, C., Carbonero, A., Jiménez-Ruiz, S., Caballero, J., Rodríguez, P., García-Bocanegra, I., Perea, M.A., Arenas-Montes, A., 2018. Evaluación de la imagen térmica infrarroja para el diagnóstico de la tuberculosis bovina mediante intradermotuberculinización, in: II Congreso Nacional de Sanidad Animal. Córdoba (Spain), pp. 26–27.
- Arrieta-Villegas, C., Perálvarez, T., Vidal, E., Puighibet, Z., Moll, X., Canturri, A., Sevilla, I.A., Espada, Y., Juste, R.A., Domingo, M., Pérez De Val, B., 2018. Efficacy of parenteral vaccination against tuberculosis with heat-inactivated *Mycobacterium bovis* in experimentally challenged goats. *PLoS ONE*. 13 (5): e0196948. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196948>.
- Balseiro, A., Altuzarra, R., Vidal, E., Moll, X., Espada, Y., Sevilla, I.A., Domingo, M., Garrido, J.M., Juste, R.A., Prieto, M., Pérez De Val, B., 2017. Assessment of BCG and inactivated *Mycobacterium bovis* vaccines in an experimental tuberculosis infection model in sheep. *PLoS ONE*. 12 (7): e0180546. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180546>.
- Balseiro, A., Oleaga, A., Álvarez Morales, L.M., González Quirós, P., Gortázar, C., Prieto, M., n.d. Effectiveness of a calf selective feeder in preventing wild boar Access. *European Journal of Wildlife Research*. enviado.
- Balseiro, A., Prieto, M., Álvarez, V., Martínez de Egidua, M., Gerrikagoitia, X., Torrontegui, O., Leseillier, S., Davé, D., Salguero, F.J., Sevilla, I.A., Garrido, J., Juste, R.A., Barral, M., 2018. Assessment of BCG and inactivated *Mycobacterium bovis* vaccines in an experimental tuberculosis infection model in European badger (*Meles meles*), in: 13th European Wildlife Disease Association Conference. Larissa (Greece).
- Barasona, J.A., Latham, M.C., Acevedo, P., Armenteros, J.A., Latham, A.D.M., Gortazar, C., Carro, F., Soriguer, R.C., Vicente, J., 2014. Spatiotemporal interactions between wild boar and cattle: Implications for cross-species disease transmission. *Veterinary Research*. 45 : 122. <https://doi.org/10.1186/s13567-014-0122-7>.
- Barasona, J.A., Torres, M.J., Aznar, J., Gortázar, C., Vicente, J., 2017a. DNA Detection Reveals *Mycobacterium tuberculosis* Complex Shedding Routes in Its Wildlife Reservoir the Eurasian Wild Boar. *Transboundary and Emerging Diseases*. 64 (3): 906–915. <https://doi.org/10.1111/tbed.12458>.
- Barasona, J.A., VerCauteren, K.C., Saklou, N., Gortázar, C., Vicente, J., 2013. Effectiveness of cattle operated bump gates and exclusion fences in preventing ungulate multi-host sanitary interaction. *Preventive Veterinary Medicine*. 111 (1–2): 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.03.009>.
- Barasona, J.A., Vicente, J., Díez-Delgado, I., Aznar, J., Gortázar, C., Torres, M.J., 2017b. Environmental Presence of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Aggregation Points at the Wildlife/Livestock Interface. *Transboundary and Emerging Diseases*. 64 (4): 1148–1158.
- Beltrán-Beck, B., Romero, B., Sevilla, I.A., Barasona, J.A., Garrido, J.M., González-Barrío, D., Díez-Delgado, I., Minguijón, E., Casal, C., Vicente, J., Gortázar, C., Aranaz, A., 2014. Assessment of an oral *Mycobacterium*

bovis BCG vaccine and an inactivated *M. bovis* preparation for wild boar in terms of adverse reactions, vaccine strain survival, and uptake by nontarget species. *Clinical and Vaccine Immunology*. 21 (1): 12–20. <https://doi.org/10.1128/CVI.00488-13>.

Benítez-Medina, J.M., 2015. Estudio epidemiológico de tuberculosis humana en Extremadura. Tesis doctoral. Universidad de Extremadura. Departamento de Sanida.

Benítez-Medina, J.M., Martínez, R., Galapero, J., Gómez, L., Jiménez, N., García, A., López, F., Rodríguez, C., Hermoso de Mendoza, J., 2018. Valoración del aporte suplementario de vitamina D como método complementario para el control de la tuberculosis en ganado bovino. XXIII Congreso Internacional ANEM-BE de Medicina Bovina.

Bezós, J., Casal, C., Álvarez, J., Díez-Guerrier, A., Rodríguez-Bertos, A., Romero, B., Rueda, P., López, L., Domínguez, L., De Juan, L., 2013. Evaluation of the performance of cellular and serological diagnostic tests for the diagnosis of tuberculosis in an alpaca (*Vicugna pacos*) herd naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *Preventive Veterinary Medicine*. 111 (3–4): 304–313. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.05.013>.

Bezós, J., Casal, C., Álvarez, J., Roy, A., Romero, B., Rodríguez-Bertos, A., Bárcena, C., Díez, A., Juste, R., Gortázar, C., Puentes, E., Aguiló, N., Martín, C., de Juan, L., Domínguez, L., 2017. Evaluation of the *Mycobacterium tuberculosis* SO2 vaccine using a natural tuberculosis infection model in goats. *Veterinary Journal*. 223 : 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.04.006>.

Bezós, J., Casal, C., Díez-Delgado, I., Romero, B., Liandris, E., Álvarez, J., Sevilla, I.A., de Juan, L., Domínguez, L., Gortázar, C., 2015a. Goats challenged with different members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex display different clinical pictures. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 167 (3–4): 185–189. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2015.07.009>.

Bezós, J., Casal, C., Puentes, E., Díez-Guerrier, A., Romero, B., Aguiló, N., de Juan, L., Martín, C., Domínguez, L., 2015b. Evaluation of the immunogenicity and diagnostic interference caused by *M. tuberculosis* SO2 vaccination against tuberculosis in goats. *Research in Veterinary Science*. 103 : 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2015.09.017>.

Bezós, J., Romero, B., Delgado, A., Alvarez, J., Casal, C., Venteo, A., Gonzalez, I., Domínguez, L., De Juan, L., 2014. Evaluation of the specificity of intradermal tuberculin and serological tests for diagnosis of tuberculosis in alpaca (*Vicugna pacos*) and llama (*Lama glama*) herds under field conditions in Peru. *Veterinary Record*. 174 (21): 532. <https://doi.org/10.1136/vr.102463>.

Bezós, J., Roy, Á., Infantes-Lorenzo, J.A., González, I., Venteo, Á., Romero, B., Grau, A., Mínguez, O., Domínguez, L., de Juan, L., 2018. The use of serological tests in combination with the intradermal tuberculin test maximizes the detection of tuberculosis infected goats. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 199 : 43–52. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2018.03.006>.

Bielby, J., Mace, G.M., Bininda-Emonds, O.R.P., Cardillo, M., Gittleman, J.L., Jones, K.E., Orme, C.D.L., Purvis, A., 2007. The Fast-Slow Continuum in Mammalian Life History: An Empirical Reevaluation. *The American Naturalist*. 169 (6): 748–757. <https://doi.org/10.1086/516847>.

Blanco, F.C., Bianco, M. V., Garbaccio, S., Meikle, V., Gravisaco, M.J., Montenegro, V., Alfonseca, E., Singh, M., Barandiaran, S., Canal, A., Vagnoni, L., Buddle, B.M., Bigi, F., Cataldi, A., 2013. *Mycobacterium bovis* $\Delta mce2$ double deletion mutant protects cattle against challenge with virulent *M. bovis*. *Tuberculosis*. 93 (3): 363–372. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2013.02.004>.

- Boadella, M., Acevedo, P., Vicente, J., Mentaberre, G., Balseiro, A., Arnal, M., Martínez, D., García-Bocanegra, I., Casal, C., Alvarez, J., Oleaga, A., Lavin, S., Muñoz, M., Sáez-Llorente, J.L., de la Fuente, J., Gortázar, C., 2011. Spatio-temporal trends of Iberian wild boar contact with *Mycobacterium tuberculosis* complex detected by ELISA. *EcoHealth*. 8 (4): 478–484. <https://doi.org/10.1007/s10393-011-0713-y>.
- Boadella, M., Vicente, J., Ruiz-Fons, F., de la Fuente, J., Gortázar, C., 2012. Effects of culling Eurasian wild boar on the prevalence of *Mycobacterium bovis* and Aujeszky's disease virus. *Preventive Veterinary Medicine*. 107 (3–4): 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.06.001>.
- Botelho, A., Perdigão, J., Canto, A., Albuquerque, T., Leal, N., Macedo, R., Portugal, I., Cunha, M. V., 2014. Pre-multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain associated with disseminated tuberculosis in a pet dog. *Journal of Clinical Microbiology*. 52 (1): 354–356. <https://doi.org/10.1128/JCM.02800-13>.
- Buddle, B.M., Parlane, N.A., Chambers, M.A., Gortázar, C., 2018. Vaccination of domestic and wild animals against tuberculosis, in: Chambers, M., Gordon, S., Olea-Popelka, F., Barrow, P. (Eds.), *Bovine Tuberculosis*. <https://doi.org/10.1079/9781786391520.0206>.
- Buddle, B.M., Wards, B.J., Aldwell, F.E., Collins, D.M., De Lisle, G.W., 2002. Influence of sensitisation to environmental mycobacteria on subsequent vaccination against bovine tuberculosis. *Vaccine*. 20 (7–8): 1126–1133. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(01\)00436-4](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(01)00436-4).
- Cagatay, G.N., Antos, A., Meyer, D., Maistrelli, C., Keuling, O., Becher, P., Postel, A., 2018. Frequent infection of wild boar with atypical porcine pestivirus (APPV). *Transboundary and Emerging Diseases*. 65 (4): 1087–1093. <https://doi.org/10.1111/tbed.12854>.
- Cano-Terriza, D., Rivalde, M.A., Jiménez-Ruiz, S., Vicente, J., Isla, J., Paniagua, J., Moreno, I., Gortázar, C., Infantes-Lorenzo, J.A., García-Bocanegra, I., 2018a. Management of hunting waste as control measure for tuberculosis in wild ungulates in south-central Spain. *Transboundary and Emerging Diseases*. 65 (5): 1190–1196. <https://doi.org/10.1111/tbed.12857>.
- Cano-Terriza, D., Rivalde, M.A., Paniagua, J., Isla, J., Moreno, I., Bezos, J., Arenas-Casas, A., García-Bocanegra, I., 2018b. Epidemiological and molecular surveillance of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in wild ungulates from southern Spain, 2011–2018, in: 13th Conference of the European Wildlife Disease Association (EWDA). Larissa (Greece), p. 115.
- Cano-Terriza, D., Rivalde, M.A., Rodríguez-Hernández, P., Napp, S., Fernández-Morente, M., Moreno, I., Bezos, J., Fernández-Molera, V., Sáez, J.L., García-Bocanegra, I., 2018c. Epidemiological surveillance of *Mycobacterium tuberculosis* complex in extensively raised pigs in the south of Spain. *Preventive Veterinary Medicine*. 159 : 87–91. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.08.015>.
- Carpio, A.J., Castro-López, J., Guerrero-Casado, J., Ruiz-Aizpurua, L., Vicente, J., Tortosa, F.S., 2014a. Effect of wild ungulate density on invertebrates in a Mediterranean ecosystem. *Animal Biodiversity and Conservation*. 37 (2): 115–125.
- Carpio, A.J., Guerrero-Casado, J., Tortosa, F.S., Vicente, J., 2014b. Predation of simulated red-legged partridge nests in big game estates from South Central Spain. *European Journal of Wildlife Research*. 60 (2): 391–394. <https://doi.org/10.1007/s10344-013-0786-8>.
- Carrasco-García, R., Barasona, J.A., Gortázar, C., Montoro, V., Sánchez-Vizcaino, J.M., Vicente, J., 2016. Wildlife and livestock use of extensive farm resources in South Central Spain: implications for disease transmission. *European Journal of Wildlife Research*. 62 (1): 65–78. <https://doi.org/10.1007/s10344-015-0974-9>.

- Carrasco-García, R., Barroso, P., Pérez-Olivares, J., Montoro, V., Vicente, J., 2018. Consumption of Big Game Remains by Scavengers: A Potential Risk as Regards Disease Transmission in Central Spain. *Frontiers in Veterinary Science*. 5 : 4. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00004>.
- Carvalho, J., 2019. The role of environmental conditions, size-selective harvesting and diseases on the life-history traits of Iberian ibex. PhD Thesis.
- Carvalho, J., Fandos, P., Festa-Bianchet, M., Büntgen, U., Fonseca, C., Serrano, E., 2018a. Sustainable trophy hunting of Iberian ibex. *Galemys, Spanish Journal of Mammalogy*. 30 : 1–4. <https://doi.org/10.7325/galemys.2018.fl>.
- Carvalho, J., Martins, L., Silva, J.P., Santos, J., Torres, R.T., Fonseca, C., 2012. Habitat suitability model for red deer (*Cervus elaphus* Linnaeus, 1758): spatial multicriteria analysis with GIS application. *Galemys, Spanish Journal of Mammalogy*. 24 : 47–56.
- Carvalho, J., Santos, J.P. V., Torres, R.T., Santarém, F., Fonseca, C., 2018b. Tree-Based Methods: Concepts, Uses and Limitations under the Framework of Resource Selection Models. *Journal of Environmental Informatics*. 32 : 112–124. <https://doi.org/10.3808/jei.201600352>.
- Carvalho, J., Torres, R.T., Acevedo, P., Santos, J.P. V., Barros, T., Serrano, E., Fonseca, C., 2018c. Propagule pressure and land cover changes as main drivers of red and roe deer expansion in mainland Portugal. *Diversity and Distributions*. 24 (4): 551–564. <https://doi.org/10.1111/ddi.12703>.
- Casal, C., Alvarez, J., Bezos, J., Quick, H., Díez-Guerrier, A., Romero, B., Saez, J.L., Liandris, E., Navarro, A., Perez, A., Domínguez, L., de Juan, L.D., 2015. 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. *Preventive Veterinary Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.07.001>.
- Casal, C., Infantes, J.A., Rísalde, M.A., Díez-Guerrier, A., Domínguez, M., Moreno, I., Romero, B., De Juan, L., Sáez, J.L., Juste, R., Gortázar, C., Domínguez, L., Bezos, J., 2017. Antibody detection tests improve the sensitivity of tuberculosis diagnosis in cattle. *Research in Veterinary Science*. 112 : 214–221. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.05.012>.
- Castillo, L., Fernández-Llario, P., Mateos, C., Carranza, J., Benítez-Medina, J.M., García-Jiménez, W., Bermejo-Martín, F., Hermoso de Mendoza, J., 2011. Management practices and their association with *Mycobacterium tuberculosis* complex prevalence in red deer populations in Southwestern Spain. *Preventive Veterinary Medicine*. 98 (1): 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2010.11.008>.
- Cellina, S., 2008. Effects of supplemental feeding on the body condition and reproductive state of wild boar *Sus scrofa* in Luxembourg. PhD Thesis. Diss. Univ. of Sussex. Univ. of Sussex. <https://doi.org/10.13140/2.1.5077.6642>.
- Chambers, M.A., Carter, S.P., Wilson, G.J., Jones, G., Brown, E., Hewinson, R.G., Vordermeier, M., 2014. Vaccination against tuberculosis in badgers and cattle: An overview of the challenges, developments and current research priorities in Great Britain. *Veterinary Record*. 175 (4): 90–96. <https://doi.org/10.1136/vr.102581>.
- Che-Amat, A., Armenteros, J.A., González-Barrio, D., Lima, J.F., Díez-Delgado, I., Barasona, J.A., Romero, B., Lyashchenko, K.P., Ortiz, J.A., Gortázar, C., 2016a. Is targeted removal a suitable means for tuberculosis control in wild boar? *Preventive Veterinary Medicine*. 135 : 132–135. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.11.002>.

- Che-Amat, A., Risalde, M.Á., González-Barrio, D., Ortiz, J.A., Gortázar, C., 2016b. Effects of repeated comparative intradermal tuberculin testing on test results: A longitudinal study in TB-free red deer. *BMC Veterinary Research*. 12 (1): 184. <https://doi.org/10.1186/s12917-016-0825-2>.
- Ciaravino, G., García-Saenz, A., Cabras, S., Allepuz, A., Casal, J., García-Bocanegra, I., De Koeijer, A., Gubbins, S., Sáez, J.L., Cano-Terriza, D., Napp, S., 2018. Assessing the variability in transmission of bovine tuberculosis within Spanish cattle herds. *Epidemics*. 23 : 110–120. <https://doi.org/10.1016/j.epidem.2018.01.003>.
- Ciaravino, G., Ibarra, P., Casal, E., López, 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? *Frontiers in Veterinary Science*. 4 : 202. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00202>.
- Cinque, S., Johansson, M., Morf, A., 2013. Human Dimensions of Wildlife Management. *Wildlife Biology*. 19 (3): 335–336. <https://doi.org/10.2981/0909-6396-19.3.335>.
- Costa, P., Amaro, A., Botelho, A., Inácio, J., Baptista, P. V., 2010. Gold nanoprobe assay for the identification of mycobacteria of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Clinical Microbiology and Infection*. 16 (9): 1464–1469. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2010.03120.x>.
- Costa, P., Amaro, A., Ferreira, A.S., Machado, D., Albuquerque, T., Couto, I., Botelho, A., Viveiros, M., Inácio, J., 2014. Rapid identification of veterinary-relevant *Mycobacterium tuberculosis* complex species using 16S rDNA, IS6110 and Regions of Difference-targeted dual-labelled hydrolysis probes. *Journal of Microbiological Methods*. 107 : 13–22. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.08.017>.
- Costa, P., Ferreira, A.S., Amaro, A., Albuquerque, T., Botelho, A., Couto, I., Cunha, M. V., Viveiros, M., Inácio, J., 2013. Enhanced detection of tuberculous mycobacteria in animal tissues using a semi-nested probe-based real-time PCR. *PLoS ONE*. 8 (11): e81337. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081337>.
- Cowie, C.E., Gortázar, C., White, P.C.L., Hutchings, M.R., Vicente, J., 2015. Stakeholder opinions on the practicality of management interventions to control bovine tuberculosis. *Veterinary Journal*. 204 (2): 179–185. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.02.022>.
- Cowie, C.E., Hutchings, M.R., Barasona, J.A., Gortázar, C., Vicente, J., White, P.C.L., 2016. Interactions between four species in a complex wildlife: livestock disease community: implications for *Mycobacterium bovis* maintenance and transmission. *European Journal of Wildlife Research*. 62 (1): 51–64. <https://doi.org/10.1007/s10344-015-0973-x>.
- Cowie, C.E., Marreos, N., Gortázar, C., Jaroso, R., White, P.C.L., Balseiro, A., 2014. Shared risk factors for multiple livestock diseases: A case study of bovine tuberculosis and brucellosis. *Research in Veterinary Science*. 97 (3): 491–497. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.09.002>.
- Cross, M.L., Henderson, R.J., Lambeth, M.R., Buddle, B.M., Aldwell, F.E., 2009. Lipid-formulated BCG as an oral-bait vaccine for tuberculosis: vaccine stability, efficacy, and palatability to brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*) in New Zealand. *Journal of Wildlife Diseases*. 45 (3): 754–765.
- Cruz, T., Fonseca, C., Carvalho, J., Oliveira, B., Torres, R.T., 2014. Roe deer reintroduction in central Portugal: a tool for Iberian wolf conservation. *Galemys, Spanish Journal of Mammalogy*. 26 : 31–40.
- Cunha, M. V., Matos, F., Canto, A., Albuquerque, T., Alberto, J.R., Aranha, J.M., Vieira-Pinto, M., Botelho, A., 2012. Implications and challenges of tuberculosis in wildlife ungulates in Portugal: A molecular epidemiology perspective. *Research in Veterinary Science*. 92 (2): 225–235. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.03.009>.

- Cunha, M. V., Monteiro, M., Carvalho, P., Mendonça, P., Albuquerque, T., Botelho, A., 2011. Multihost Tuberculosis: Insights from the portuguese control program. *Veterinary Medicine International*. 795165. <https://doi.org/10.4061/2011/795165>.
- de Klerk, L.M., Michel, A.L., Bengis, R.G., Kriek, N.P.J., Godfroid, J., 2010. BCG vaccination failed to protect yearling African buffaloes (*Syncerus caffer*) against experimental intratonsillar challenge with *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 137 (1-2): 84-92. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2010.04.013>.
- de la Cruz, M.L., Branscum, A.J., Nácar, J., Pages, E., Pozo, P., Pérez, A., Grau, A., Sáez, J.L., de Juan, L., Díaz, R., Mínguez, O., Álvarez, J., 2018. Evaluation of the Performance of the IDvet IFN-Gamma Test for Diagnosis of Bovine Tuberculosis in Spain. *Frontiers in veterinary science*. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00229>.
- de La Cruz, M.L., Pérez, A., Bezos, J., Pages, E., Casal, C., Carpintero, J., Romero, B., Domínguez, L., Barker, C.M., Díaz, R., Álvarez, J., 2014. Spatial dynamics of bovine tuberculosis in the autonomous community of madrid, spain (2010-2012). *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115632>.
- Dean, G.S., Clifford, D., Whelan, A.O., Tchilian, E.Z., Beverley, P.C.L., Salguero, F.J., Xing, Z., Vordermeier, H.M., Villarreal-Ramos, B., 2015. Protection induced by simultaneous subcutaneous and endobronchial vaccination with BCG/BCG and BCG/adenovirus expressing antigen 85A against *Mycobacterium bovis* in cattle. *PLoS ONE*. 10 (11): e0142270. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142270>.
- Decker, D.J., Riley, S.J., Siemer, W.F., 2012. Human dimensions of wildlife management, in: *Human Dimensions of Wildlife Management*. The John Hopkins University Presse, Baltimore, pp. 3-14.
- Díez-Delgado, I., Sevilla, I.A., Romero, B., Tanner, E., Barasona, J.A., White, A.R., Lurz, P.W.W., Boots, M., de la Fuente, J., Domínguez, L., Vicente, J., Garrido, J.M., Juste, R.A., Aranaz, A., Gortazar, C., 2018. Impact of piglet oral vaccination against tuberculosis in endemic free-ranging wild boar populations. *Preventive Veterinary Medicine*. 155 : 11-20. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.04.002>.
- Díez-Guerrier, A., Roy, A., de la Cruz, M.L., Sáez, J.L., Sanz, C., Boschioli, M.L., Romero, B., de Juan, L., Domínguez, L., Bezos, J., 2018. Evaluation of the use of a needle-free injection syringe as a cause of non-specific reactions in the intradermal tuberculin test used for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science*. 119 : 56-60. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.05.016>.
- Direção Geral de Alimentação e Veterinária, A., 2011. Tuberculose em caça maior.
- Dirección General de Ganadería, D., Gobierno de Canarias, G., 2016. Experiencia piloto, estudio sobre el efecto de la vacunación frente a la PTBC caprina 2014-2015-2016.
- Dirección General de Ganadería, D., Gobierno de Canarias, G., 2018. Diagnóstico Anatomopatológico en bovinos y pequeños rumiantes IDT + o dudosos 2005-2018.
- Duarte, E.L., Domingos, M., Amado, A., Cunha, M. V., Botelho, A., 2010. MIRU-VNTR typing adds discriminatory value to groups of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* strains defined by spoligotyping. *Veterinary Microbiology*. 143 (2-4): 299-306. [https://doi.org/S0378-1135\(09\)00576-8](https://doi.org/S0378-1135(09)00576-8) [pii] 10.1016/j.vetmic.2009.11.027.
- European Union, E., 2004. Regulamento (CE) N.º 853/2004 de 29 de Abril de 2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, que estabelece regras específicas de higiene aplicáveis aos géneros alimentícios de origem animal. *Jornal Oficial da União Europeia*. 139 : 55-75.

- Fernández-de-Mera, I.G., Vicente, J., Höfle, U., Ruiz-Fons, F., Ortiz, J.A., Gortázar, C., 2009. Factors affecting red deer skin test responsiveness to bovine and avian tuberculin and to phytohaemagglutinin. *Preventive Veterinary Medicine*. 90 (1–2): 119–126. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2009.04.005>.
- Fonseca, C., Migueis, D., Fernandes, T., Carvalho, H., Loureiro, A., Carvalho, J., Torres, R.T., 2017. The return of the Iberian wild goat *Capra pyrenaica* to Portugal: From reintroduction to recolonization. *Journal for Nature Conservation*. 38 : 56–61. <https://doi.org/10.1016/j.jnc.2017.05.006>.
- Frank, B., Monaco, A., Bath, A.J., 2015. Beyond standard wildlife management: a pathway to encompass human dimension findings in wild boar management. *European Journal of Wildlife Research*. 61 (5): 723–730. <https://doi.org/10.1007/s10344-015-0948-y>.
- Frauendorf, M., 2015. The reproductive response of wild boar on environmental and physiological factors as well as hunting in Germany. Master of Science. Wageningen University Wageningen.
- Frauendorf, M., Gethöffer, F., Siebert, U., Keuling, O., 2016. The influence of environmental and physiological factors on the litter size of wild boar (*Sus scrofa*) in an agriculture dominated area in Germany. *Science of the Total Environment*. 541 : 877–882. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.128>.
- Gamelon, M., Focardi, S., Baubet, E., Brandt, S., Franzetti, B., Ronchi, F., Venner, S., Sæther, B.E., Gaillard, J.M., 2017. Reproductive allocation in pulsed-resource environments: a comparative study in two populations of wild boar. *Oecologia*. 183 (4): 1065–1076. <https://doi.org/10.1007/s00442-017-3821-8>.
- García-Bocanegra, I., Barranco, I., Rodríguez-Gómez, I.M., Pérez, B., Gómez-Laguna, J., Rodríguez, S., Ruiz-Villamayor, E., Perea, A., 2010. Tuberculosis in alpacas (*Lama pacos*) caused by *Mycobacterium bovis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 48 (5): 1960–1964. <https://doi.org/10.1128/JCM.02518-09>.
- García-Bocanegra, I., Perez de Val, B., Arenas-Montes, A., Paniagua, J., Boadella, M., Gortázar, C., Arenas, A., 2012. Seroprevalence and risk factors associated to *Mycobacterium bovis* in wild artiodactyl species from southern Spain, 2006–2010. *PLoS ONE*. 7 (4): e34908. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034908> PONE-D-11-22972 [pii].
- García-Jiménez, W.L., Benítez-Medina, J.M., Fernández-Llario, P., Abecia, J.A., García-Sánchez, A., Martínez, R., Risco, D., Ortiz-Peláez, A., Salguero, F.J., Smith, N.H., Gómez, L., Hermoso de Mendoza, J., 2013a. Comparative Pathology of the Natural infections by *Mycobacterium bovis* and by *Mycobacterium caprae* in Wild Boar (*Sus scrofa*). *Transboundary and Emerging Diseases*. 60 (2): 102–109. <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2012.01321.x>.
- García-Jiménez, W.L., Cortés, M., Benítez-Medina, J.M., Hurtado, I., Martínez, R., García-Sánchez, A., Risco, D., Cerrato, R., Sanz, C., Hermoso-de-Mendoza, M., Fernández-Llario, P., Hermoso-de-Mendoza, J., 2016. Spoligotype diversity and 5-year trends of bovine tuberculosis in Extremadura, southern Spain. *Tropical Animal Health and Production*. 48 (8): 1533–1540. <https://doi.org/10.1007/s11250-016-1124-4>.
- García-Jiménez, W.L., Fernández-Llario, P., Benítez-Medina, J.M., Cerrato, R., Cuesta, J., García-Sánchez, A., Gonçalves, P., Martínez, R., Risco, D., Salguero, F.J., Serrano, E., Gómez, L., Hermoso-de-Mendoza, J., 2013b. Reducing Eurasian wild boar (*Sus scrofa*) population density as a measure for bovine tuberculosis control: Effects in wild boar and a sympatric fallow deer (*Dama dama*) population in Central Spain. *Preventive Veterinary Medicine*. 110 (3–4): 435–46. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.02.017>.
- García-Jiménez, W.L., Fernández-Llario, P., Gómez, L., Benítez-Medina, J.M., García-Sánchez, A., Martínez, R., Risco, D., Gough, J., Ortiz-Peláez, A., Smith, N.H., Mendoza, J.H. de, Salguero, F.J., 2012.

- Histological and immunohistochemical characterisation of *Mycobacterium bovis* induced granulomas in naturally infected Fallow deer (*Dama dama*). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 149 (1-2): 66-75. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.06.010>.
- García-Jiménez, W.L., Salguero, F.J., Fernández-Llario, P., Martínez, R., Risco, D., Gough, J., Ortiz-Peláez, A., Hermoso-de-Mendoza, J. Gómez, L., 2013c. Immunopathology of granulomas produced by *Mycobacterium bovis* in naturally infected wild boar. *Vet Immunol Immunopathol*. 156 (1-2): 54-63. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.09.008>.
- García-Saenz, A., Napp, S., Lopez, S., Casal, J., Allepuz, A., 2015. Estimation of the individual slaughterhouse surveillance sensitivity for bovine tuberculosis in Catalonia (North-Eastern Spain). *Preventive Veterinary Medicine*. 121 (3-4): 332-337. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.08.008>.
- García-Sánchez, A., Gómez, L., Fernández-Llario, P., Parra, A., Hermoso de Mendoza, J., 2007. Tuberculous meningoencephalitis in a wild boar. *Journal of wildlife diseases*. 43 (4): 780-783. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-43.4.780>.
- Garrido, J.M., Sevilla, I.A., Beltrán-Beck, B., Minguijón, E., Ballesteros, C., Galindo, R.C., Boadella, M., Lyashchenko, K.P., Romero, B., Geijo, M. V., Ruiz-Fons, F., Aranaz, A., Juste, R.A., Vicente, J., de la Fuente, J., Gortázar, C., 2011. Protection against tuberculosis in eurasian wild boar vaccinated with heat-inactivated *Mycobacterium bovis*. *PLoS ONE*. 6 (9): e24905. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024905>.
- Gethöffer, F., Sodeikat, G., Pohlmeier, K., 2007. Reproductive parameters of wild boar (*Sus scrofa*) in three different parts of Germany. *European Journal of Wildlife Research*. 53 (4): 287-297. <https://doi.org/10.1007/s10344-007-0097-z>.
- Glikman, J.A., Frank, B., 2011. Human dimensions of wildlife in Europe: The Italian way. *Human Dimensions of Wildlife*. 16 : 368-377. <https://doi.org/10.1080/10871209.2011.597000>.
- Gonçalves, R., 2015. Contribuição para o estudo da Tuberculose bovina em caça maior e em bovinos no concelho de Idanha-a-Nova. Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Gortázar, C., Acevedo, P., Ruiz-Fons, F., Vicente, J., 2006. Disease risks and overabundance of game species. *European Journal of Wildlife Research*. 52 (2): 81-87. <https://doi.org/10.1007/s10344-005-0022-2>.
- Gortázar, C., Beltrán-Beck, B., Garrido, J.M., Aranaz, A., Sevilla, I.A., Boadella, M., Lyashchenko, K.P., Galindo, R.C., Montoro, V., Domínguez, L., Juste, R., de la Fuente, J., 2014. Oral re-vaccination of Eurasian wild boar with *Mycobacterium bovis* BCG yields a strong protective response against challenge with a field strain. *BMC Veterinary Research*. 10 : 96. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-10-96>.
- Gortázar, C., Fernández-Calle, L.M., Collazos-Martínez, J.A., Mínguez-González, O., Acevedo, P., 2017. Animal tuberculosis maintenance at low abundance of suitable wildlife reservoir hosts: A case study in northern Spain. *Preventive Veterinary Medicine*. 146 : 150-157. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.08.009>.
- Gortázar, C., Torres, M.J., Acevedo, P., Aznar, J., Negro, J.J., de la Fuente, J., Vicente, J., 2011. Fine-tuning the space, time, and host distribution of mycobacteria in wildlife. *BMC Microbiology*. 11 (1): 27. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-27> [pii] 10.1186/1471-2180-11-27.
- Gortázar, C., Torres, M.J., Vicente, J., Acevedo, P., Reglero, M., de la Fuente, J., Negro, J.J., Aznar-Martín, J., 2008. Bovine tuberculosis in Donana Biosphere Reserve: the role of wild ungulates as disease reservoirs in the last Iberian lynx strongholds. *PLoS ONE*. 3 (7): e2776. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002776>.

- Hermoso de Mendoza, J., Parra, A., Tato, A., Alonso, J.M., Rey, J.M., Pena, J., García-Sánchez, A., Larrasa, J., Teixido, J., Manzano, G., Cerrato, R., Pereira, G., Fernández-Llarío, 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. 74 (2-3): 239-247. [https://doi.org/S0167-5877\(05\)00276-X](https://doi.org/S0167-5877(05)00276-X) [pii] 10.1016/j.prevetmed.2005.10.005.
- Infantes-Lorenzo, J.A., Dave, D., Moreno, I., Anderson, P., Lesellier, S., Gormley, E., Domínguez, L., Balseiro, A., Gortázar, C., Domínguez, M., Salguero, F.J., 2019a. New serological platform for detecting antibodies against *Mycobacterium tuberculosis* complex in European badgers. Veterinary Medicine and Science. 5 (1): 61-69. <https://doi.org/10.1002/vms3.134>.
- Infantes-Lorenzo, J.A., Moreno, I., Rivalde, M.Á., Roy, Á., Villar, M., Romero, B., Ibarrola, N., De La Fuente, J., Puentes, E., De Juan, L., Gortázar, C., Bezos, J., Domínguez, L., Domínguez, M., 2017. Proteomic characterisation of bovine and avian purified protein derivatives and identification of specific antigens for serodiagnosis of bovine tuberculosis. Clinical Proteomics. 14 : 36. <https://doi.org/10.1186/s12014-017-9171-z>.
- Infantes-Lorenzo, J.A., Moreno, I., Roy, A., Rivalde, M.A., Balseiro, A., de Juan, L., Romero, B., Bezos, J., Puentes, E., Åkerstedt, J., Tessema, G.T., Gortázar, C., Domínguez, L., Domínguez, M., 2019b. Specificity of serological test for detection of tuberculosis in cattle, goats, sheep and pigs under different epidemiological situations. BMC veterinary research. 15 (1): 70.
- Infantes-Lorenzo, J.A., Whitehead, C., Moreno, I., Bezos, J., Roy, A., Domínguez, L., Domínguez, M., Salguero, F.J., 2018. Development and Evaluation of a Serological Assay for the Diagnosis of Tuberculosis in Alpacas and Llamas. Frontiers in Veterinary Science. 13 (5): 189. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00189>.
- Jaroso, R., Vicente, J., Martín-Hernando, M.P., Aranaz, A., Lyashchenko, K., Greenwald, R., Esfandiari, J., Gortázar, C., 2010. Ante-mortem testing wild fallow deer for bovine tuberculosis. Veterinary Microbiology. 146 (3-4): 285-289. [https://doi.org/S0378-1135\(10\)00249-X](https://doi.org/S0378-1135(10)00249-X) [pii] 10.1016/j.vetmic.2010.05.022.
- Jiménez-Ruiz, S., García-Bocanegra, I., Díaz, J.M., Cano-Terriza, D., Isla, J., Rodríguez-Hernández, P., Caballero-Gómez, J., Romero-Herrera, P., Arenas, A., Paniagua, J., 2018. Evaluación de la gestión de subproductos procedentes de actividades cinegéticas de caza mayor en muladares de Sierra Morena (sur de España), in: 36èmes Rencontres Du GEEFSM. L'Ariège (France).
- Kao, S.Y.Z., VanderWaal, K., Enns, E.A., Craft, M.E., Alvarez, J., Picasso, C., Wells, S.J., 2018. Modeling cost-effectiveness of risk-based bovine tuberculosis surveillance in Minnesota. Preventive Veterinary Medicine. 159 : 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.08.011>.
- Keuling, O., 2009. Managing Wild Boar - Considerations for wild boar management based on game biology data. PhD Thesis. Dresden University of Technology.
- Keuling, O., 2013. Schwarzwild: Bejagungsstrategien und Schadvermeidung, in: Raumberg-Gumpenstein, H. (Ed.), 19. Österreichische Jägertagung. pp. 11-14.
- Keuling, O., 2018. Schwarzwild: Status Quo und neue Konzepte zur Reduktion, in: Raumberg-Gumpenstein, H. (Ed.), 24. Österreichische Jägertagung. pp. 49-56.
- Keuling, O., Baubet, E., Duscher, A., Ebert, C., Fischer, C., Monaco, A., Podgórski, T., Prevot, C., Ronnenberg, K., Sodeikat, G., Stier, N., Thurfjell, H., 2013. Mortality rates of wild boar *Sus scrofa* L. in central Europe. European Journal of Wildlife Research. 59 (6): 805-814. <https://doi.org/10.1007/s10344-013-0733-8>.

- Keuling, O., Herbst, C., Frauendorf, M., Siebert, U., 2016a. Schwarzwildbewirtschaftung im Hochwildring Süsing. Abschlussbericht 2012-2015. Hannover, Germany.
- Keuling, O., Podgórski, T., Monaco, A., Melletti, M., Merta, D., Albrycht, M., Genov, P. V., Gethöffer, F., Vetter, S.G., Jori, F., Scalera, R., Gongora, J., 2018. Eurasian Wild Boar *Sus scrofa* (Linnaeus, 1758), in: Ecology, Conservation and Management of Wild Pigs and Peccaries. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 202–233.
- Keuling, O., Stier, N., Roth, M., 2008. Annual and seasonal space use of different age classes of female wild boar *Sus scrofa* L. European Journal of Wildlife Research. 54 (3): 403–412. <https://doi.org/10.1007/s10344-007-0157-4>.
- Keuling, O., Stier, N., Roth, M., 2009. Commuting, shifting or remaining?. Different spatial utilisation patterns of wild boar *Sus scrofa* L. in forest and field crops during summer. Mammalian Biology. 74 (2): 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2008.05.007>.
- Keuling, O., Strauß, E., Siebert, U., 2016b. Regulating wild boar populations is “somebody else’s problem”! - Human dimension in wild boar management. Science of the Total Environment. 554–555 : 311–319. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.02.159>.
- Khatri, B., Whelan, A., Clifford, D., Petrera, A., Sander, P., Vordermeier, H.M., 2014. BCG [zmpl vaccine induces enhanced antigen specific immune responses in cattle. Vaccine. 32 (7): 779–784. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.12.055>.
- Kukielka, E., Barasona, J.A., Cowie, C.E., Drewe, J.A., Gortazar, C., Cotarelo, I., Vicente, J., 2013. Spatial and temporal interactions between livestock and wildlife in South Central Spain assessed by camera traps. Preventive Veterinary Medicine. 112 (3–4): 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.08.008>.
- Laguna, E., Barasona, J.A., Triguero-Ocaña, R., Mulero-Pázmány, M., Negro, J.J., Vicente, J., Acevedo, P., 2018. The relevance of host overcrowding in wildlife epidemiology: A new spatially explicit aggregation index. Ecological Indicators. 84 : 695–700. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.09.039>.
- LaHue, N.P., Baños, J. V., Acevedo, P., Gortázar, C., Martínez-López, B., 2016. Spatially explicit modeling of animal tuberculosis at the wildlife-livestock interface in Ciudad Real province, Spain. Preventive Veterinary Medicine. 128 : 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2016.04.011>.
- Lombardini, M., Vidus Rosin, A., Murru, M., Cinerari, C.E., Meriggi, A., 2014. Reproductive and demographic parameters in Sardinian wild boar, *Sus scrofa meridionalis*. Folia Zoologica. 63 (4): 301–307.
- López, V., Rivalde, M.A., Contreras, M., Mateos-Hernández, L., Vicente, J., Gortázar, C., de la Fuente, J., 2018. Heat-inactivated *Mycobacterium bovis* protects zebrafish against mycobacteriosis. Journal of Fish Diseases. 41 (10): 1515–1528. <https://doi.org/10.1111/jfd.12847>.
- Lorente-Leal, V., Liandris, E., Castellanos-Rizaldos, E., Bezos, J., Domínguez, L., de Juan, L., Romero, B., n.d. Validation of a real-time PCR for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex members in bovine tissue samples. Frontiers in Veterinary Science. Accepted . <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00061>.
- Lozano-Diéguéz, B., Catalán, M., Moreno, G., Palomo, G., Martínez, R., Benítez-Medina, J.M., Hermoso de Mendoza, J., 2018. Diagnóstico ecosistémico para la prevención de la tuberculosis bovina y caprina en Extremadura. XIII Congreso de Agricultura Ecológica: Sistemas agroalimentarios agroecológicos y cambio climático.

- Malmsten, A., Dalin, A.M., 2016. Puberty in female wild boar (*Sus scrofa*) in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 58 : 55. <https://doi.org/10.1186/s13028-016-0236-1>.
- Malmsten, A., Jansson, G., Lundeheim, N., Dalin, A.M., 2017. The reproductive pattern and potential of free ranging female wild boars (*Sus scrofa*) in Sweden. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 59 : 52. <https://doi.org/10.1186/s13028-017-0321-0>.
- Marchini, S., Crawshaw, P.G., 2015. Human–Wildlife Conflicts in Brazil: A Fast-Growing Issue. *Human Dimensions of Wildlife*. 20 (4): 323–328. <https://doi.org/10.1080/10871209.2015.1004145>.
- Martinez-Guijosa, J., Lima-Barbero, J.F., Acevedo, P., Cano-Terriza, D., Jiménez-Ruiz, S., Barasona, J.A., Boadella, M., García-Bocanegra, I., Cuevas, M.I., Gortázar, C., Vicente, J., n.d. Wildlife risk mitigation programs for tuberculosis in Mediterranean Spain: on-farm assessment. *Preventive Veterinary Medicine*. in press.
- Martínez-Lopez, B., Barasona, J.A., Gortázar, C., Rodríguez-Prieto, V., Sánchez-Vizcaíno, J.M., Vicente, J., 2014. Farm-level risk factors for the occurrence, new infection or persistence of tuberculosis in cattle herds from South-Central Spain. *Preventive Veterinary Medicine*. 116 (3): 268–278. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.11.002>.
- Massei, G., Kindberg, J., Licoppe, A., Gañi, D., Šprem, N., Kamler, J., Baubet, E., Hohmann, U., Monaco, A., Ozoliš, J., Cellina, S., Podgórski, T., Fonseca, C., Markov, N., Pokorny, B., Rosell, C., Náhlik, A., 2015. Wild boar populations up, numbers of hunters down? A review of trends and implications for Europe. *Pest Management Science*. 71 (4): 492–500. <https://doi.org/10.1002/ps.3965>.
- Matos, F., Amado, A., Botelho, A., 2010a. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolated in the first outbreak of bovine tuberculosis in the Azores Islands: A case report. *Veterinarni Medicina*. 55 (3): 133–136. <https://doi.org/10.17221/137/2009-VETMED>.
- Matos, F., Cunha, M. V., Canto, A., Albuquerque, T., Amado, A., Botelho, A., 2010b. Snapshot of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* infections in livestock in an area with a low incidence of bovine tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*. 48 (11): 4337–4339. <https://doi.org/10.1128/JCM.01762-10>.
- Maue, A.C., Waters, W.R., Palmer, M. V., Whipple, D.L., Minion, F.C., Brown, W.C., Estes, D.M., 2004. CD80 and CD86, but not CD154, augment DNA vaccine-induced protection in experimental bovine tuberculosis. *Vaccine*. 23 (6): 769–779. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.07.019>.
- Muñoz-Mendoza, M., Marreros, N., Boadella, M., Gortázar, C., Menéndez, S., de Juan, L., Bezos, J., Romero, B., Copano, M.F., Amado, J., Sáez, J.L., Mourelo, J., Balseiro, A., 2013. Wild boar tuberculosis in Iberian Atlantic Spain: A different picture from Mediterranean habitats. *BMC Veterinary Research*. 9 : 176. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-176>.
- Muñoz-Mendoza, M., Romero, B., del Cerro, A., Gortázar, C., García-Marín, J.F., Menéndez, S., Mourelo, J., de Juan, L., Sáez, J.L., Delahay, R.J., Balseiro, A., 2016. Sheep as a Potential Source of Bovine TB: Epidemiology, Pathology and Evaluation of Diagnostic Techniques. *Transboundary and Emerging Diseases*. 63 (6): 635–646. <https://doi.org/10.1111/tbed.12325>.
- Naranjo, V., Gortázar, C., Vicente, J., de la Fuente, J., 2008. Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Veterinary Microbiology*. 127 (1–2): 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.10.002>.

- Orłowska, L., Rembacz, W., Florek, C., 2013. Carcass weight, condition and reproduction of wild boar harvested in north-western Poland. *Pest Management Science*. 69 (3): 367–370. <https://doi.org/10.1002/ps.3355>.
- Palacios, J.J., Navarro, Y., Romero, B., Penedo, A., Menéndez González, Á., Pérez Hernández, M.D., Fernández-Verdugo, A., Copano, F., Torreblanca, A., Bouza, E., Domínguez, L., de Juan, L., García-de-Viedma, D., 2016. Molecular and epidemiological population-based integrative analysis of human and animal *Mycobacterium bovis* infections in a low-prevalence setting. *Veterinary Microbiology*. 195 : 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.08.019>.
- Palmer, M. V., Thacker, T.C., Waters, W.R., 2009. Vaccination with *Mycobacterium bovis* BCG strains Danish and Pasteur in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) experimentally challenged with *Mycobacterium bovis*. *Zoonoses and Public Health*. 56 (5): 243–251. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01198.x>.
- Parlane, N.A., Buddle, B.M., 2015. Immunity and Vaccination against Tuberculosis in Cattle. *Current Clinical Microbiology Reports*. 2 (1): 44–53.
- Parra, A., Fernández-Llario, P., Tato, A., Larrasa, J., García, A., Alonso, J.M., Hermoso de Mendoza, M., Hermoso de Mendoza, J., 2003. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections of pigs and wild boars using a molecular approach. *Veterinary microbiology*. 97 (1–2): 123–133. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2003.08.007>.
- Parra, A., García, A., Inglis, N.F., Tato, A., Alonso, J.M., Hermoso de Mendoza, M., Hermoso de Mendoza, J., Larrasa, J., 2006. An epidemiological evaluation of *Mycobacterium bovis* infections in wild game animals of the Spanish Mediterranean ecosystem. *Research in Veterinary Science*. 80 (2): 140–146. [https://doi.org/S0034-5288\(05\)00108-6](https://doi.org/S0034-5288(05)00108-6) [pii] 10.1016/j.rvsc.2005.05.010.
- Parra, A., García, N., García, A., Lacombe, A., Moreno, F., Freire, F., Moran, J., Hermoso de Mendoza, J., 2008. Development of a molecular diagnostic test applied to experimental abattoir surveillance on bovine tuberculosis. *Veterinary microbiology*. 127 (3–4): 315–324. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.09.001>.
- Parra, A., Larrasa, J., García, A., Alonso, J.M., Hermoso de Mendoza, J., 2005. Molecular epidemiology of bovine tuberculosis in wild animals in Spain: A first approach to risk factor analysis. *Veterinary microbiology*. 110 (3–4): 293–300. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2005.07.013>.
- Perea, R., Girardello, M., San Miguel, A., 2014. Big game or big loss? High deer densities are threatening woody plant diversity and vegetation dynamics. *Biodiversity and Conservation*. 23 (5): 1303–1318. <https://doi.org/10.1007/s10531-014-0666-x>.
- Perea, R., Perea-García-Calvo, R., Díaz-Ambrona, C.G., San Miguel, A., 2015. The reintroduction of a flagship ungulate *Capra pyrenaica*: Assessing sustainability by surveying woody vegetation. *Biological Conservation*. 181 : 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.10.018>.
- Pérez-García, M., Ramírez-Herrera, T., Paz-Sánchez, Y., Díaz-Delgado, J., Suárez-Bonnet, A., Fernández, A., Andrada, M., Quesada-Canales, O., 2013. Estudio anatomopatológico de linfonodos mamarios en cabras positivas a la intradermotuberculinización, in: XXV Reunión de La Sociedad Española de Anatomía Patológica Veterinaria. Toledo, Spain, p. 72.
- Pérez de Val, B., Allepuz, A., Mercader, I., Martín, M., Cervera, Z., Soler, M., Vidal, E., 2018a. *Mycobacterium bovis* transmission between cattle and free-ranging wild ungulates in Eastern Pyrenees, in: 13th European Wildlife Disease Association Conference. Larissa (Greece), p. 158.

- Pérez de Val, B., Napp, S., Velarde, R., Lavín, S., Cervera, Z., Singh, M., Allepuz, A., Mentaberre, G., 2017. Serological Follow-up of Tuberculosis in a Wild Boar Population in Contact with Infected Cattle. *Transboundary and Emerging Diseases*. 64 (1): 275–283. <https://doi.org/10.1111/tbed.12368>.
- Pérez de Val, B., Vidal, E., López-Soria, S., Marco, A., Cervera, Z., Martín, M., Mercader, I., Singh, M., Raebber, A., Domingo, M., 2016. Assessment of safety and interferon gamma responses of *Mycobacterium bovis* BCG vaccine in goat kids and milking goats. *Vaccine*. 64 (7): 881–886. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.01.004>.
- Pérez de Val, B., Vidal, E., Mentaberre, G., Velarde, R., Mercader, I., Soler, M., Allepuz, A., 2018b. Surveillance of wildlife tuberculosis in Catalonia (Spain), a low prevalent area of bovine tuberculosis, 2012–2018, in: 13th European Wildlife Disease Association Conference. Larissa (Greece), p. 63.
- Pérez, M., Quesada-Canales, O., Paz, Y., Sacchini, S., Arbelo, M., Espinosa de los Monteros, A., Andradá, M., 2013. Histopathological Classification of the Different Stages of Lymph Node Granulomas from PPD-positive Goats. *Journal of Comparative Pathology*. 148 (1): 79. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2012.11.135>.
- Picasso-Risso, C., Gil, A., Nuñez, A., Suanes, A., Macchi, V., Salaberry, X., Álvarez, J., Pérez, A., n.d. Diagnostic interaction between bovine tuberculosis (bTB) and Johne's disease in bTB highly prevalent dairy farms of Uruguay. *Veterinary and Animal Science*. 7 : In press.
- Picasso, C., Álvarez, J., VanderWaal, K.L., Fernández, F., Gil, A., Wells, S.J., Pérez, A., 2017. Epidemiological investigation of bovine tuberculosis outbreaks in Uruguay (2011–2013). *Preventive Veterinary Medicine*. 138 : 156–161. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.01.010>.
- Postel, A., Hansmann, F., Baechlein, C., Fischer, N., Alawi, M., Grundhoff, A., Derking, S., Tenhüdfeld, J., Pfankuche, V.M., Herder, V., Baumgrtner, W., Wendt, M., Becher, P., 2016. Presence of atypical porcine pestivirus (APPV) genomes in newborn piglets correlates with congenital tremor. *Scientific Reports*. 6 : 27735. <https://doi.org/10.1038/srep27735>.
- Queiros, J., Alvarez, J., Carta, T., Mateos, A., Ortiz, J.A., Fernández-de-Mera, I.G., Martín-Hernando, M.P., Gortázar, C., 2012. Unexpected high responses to tuberculin skin-test in farmed red deer: Implications for tuberculosis control. *Preventive Veterinary Medicine*. 104 (3–4): 327–334. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2011.11.009>.
- 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): 1980. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20158-x>.
- Queirós, J., Godinho, R., Lopes, S., Gortazar, C., de la Fuente, J., Alves, P.C., 2015. Effect of microsatellite selection on individual and population genetic inferences: An empirical study using cross-specific and species-specific amplifications. *Molecular Ecology Resources*. 15 (4): 747–760. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12349>.
- Queirós, J., Vicente, J., Alves, P., de la Fuente, J., Gortázar, C., 2016. Tuberculosis, genetic diversity and fitness in the red deer, *Cervus elaphus*. *Infection, Genetics and Evolution*. 43 : 203–212.
- Queiros, J., Vicente, J., Boadella, M., Gortázar, C., Alves, P.C., 2013. The impact of management practices and past demographic history on the genetic diversity of red deer (*Cervus elaphus*): an assessment of population and individual fitness. *Biological Journal of the Linnean Society*. 111 (1): 209–223.
- Queirós, J., Villar, M., Hernández-Jarguín, A., López, V., Fernández de Mera, I., Vicente, J., Alves, P.C., Gortazar, 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 : 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2018.12.003>.

Quesada-Canales, O., Díaz-Delgado, J., Paz, Y., Domínguez, L., Bezos, J., Calabuig, P., Suárez-Bonnet, A., Fernández, A., Andrada, M., 2013. Disseminated avian mycobacteriosis in a free-living grey heron (*Ardea cinerea*). *Avian diseases*. 57 (3): 703–6. <https://doi.org/10.1637/10474-122612-Case.1>.

Risalde, M.A., López, V., Contreras, M., Mateos-Hernández, L., Gortázar, C., de la Fuente, J., 2018. Control of mycobacteriosis in zebrafish (*Danio rerio*) mucosally vaccinated with heat-inactivated *Mycobacterium bovis*. *Vaccine*. 36 (30): 4447–4453. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.06.042>.

Risalde, M.Á., Thomas, J., Sevilla, I., Serrano, M., Ortíz, J.A., Garrido, J., Domínguez, M., Domínguez, L., Gortázar, C., Ruíz-Fons, J.F., 2017. Development and evaluation of an interferon gamma assay for the diagnosis of tuberculosis in red deer experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *BMC Veterinary Research*. 13 (1): 341. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1262-6>.

Risco, D., Bravo, M., Martínez, R., Torres, A., Gonçalves, P., Cuesta, J., García-Jiménez, W., Cerrato, R., Iglesias, R., Galapero, J., Serrano, E., Gómez, L., Fernández-Llario, P., Hermoso de Mendoza, J., 2018. Vaccination Against Porcine Circovirus-2 Reduces Severity of Tuberculosis in Wild Boar. *EcoHealth*. 1–8. <https://doi.org/10.1007/s10393-018-1321-x>.

Risco, D., Fernández-Llario, P., García-Jiménez, W.L., Gonçalves, P., Cuesta, J.M., Martínez, R., Sanz, C., Sequeda, M., Gómez, L., Carranza, J., Hermoso de Mendoza, J.H., 2013. Influence of porcine circovirus type 2 infections on bovine tuberculosis in wild boar populations. *Transboundary and Emerging Diseases*. 60 (1): 121–127. <https://doi.org/10.1111/tbed.12112>.

Risco, D., Salguero, F.J., Cerrato, R., Gutierrez-Merino, J., Lanham-New, S., Barquero-Pérez, O., Hermoso de Mendoza, J., Fernández-Llario, P., 2016. Association between vitamin D supplementation and severity of tuberculosis in wild boar and red deer. *Research in veterinary science*. 108 : 116–119. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.08.003>.

Risco, D., Serrano, E., Fernández-Llario, P., Cuesta, J.M., Gonçalves, P., García-Jiménez, W.L., Martínez, R., Cerrato, R., Velarde, R., Gómez, L., Segalés, J., De Mendoza, J.H., 2014. Severity of bovine tuberculosis is associated with co-infection with common pathogens in wild boar. *PLoS ONE*. 9 (10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110123>.

Rizzi, C., Bianco, M. V., Blanco, F.C., Soria, M., Gravisaco, M.J., Montenegro, V., Vagnoni, L., Buddle, B., Garbaccio, S., Delgado, F., Leal, K.S., Cataldi, A.A., Dellagostin, O.A., Bigi, F., 2012. Vaccination with a BCG Strain Overexpressing Ag85B Protects Cattle against *Mycobacterium bovis* Challenge. *PLoS ONE*. 7 (12): e51396. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051396>.

Rodríguez-Campos, S., González, S., De Juan, L., Romero, B., Bezos, J., Casal, C., Álvarez, J., Fernández-De-Mera, I.G., Castellanos, E., Mateos, A., Sáez-Llorente, J.L., Domínguez, L., Aranaz, A., Spanish Network on Surveillance and Monitoring of Animal Tuberculosis, S., 2012. A database for animal tuberculosis (mycoDB.es) within the context of the Spanish national programme for eradication of bovine tuberculosis. *Infection, Genetics and Evolution*. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.10.008>.

Rodríguez-Prieto, V., Martínez-Lopez, B., Barasona, J.A., Acevedo, P., Romero, B., Rodríguez-Campos, S., Gortázar, C., Sánchez-Vizcaino, J.M., Vicente, J., 2012. A Bayesian approach to study the risk variables for tuberculosis occurrence in domestic and wild ungulates in South Central Spain. *BMC Veterinary Research*. 8 : 148. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-148>.

- Rodríguez, S., Bezos, J., Romero, B., de Juan, L., Álvarez, J., Castellanos, E., Moya, N., Lozano, F., Javed, M.T., Sáez-Llorente, J.L., Liébana, E., Mateos, A., Domínguez, L., Aranaz, A., Spanish Network on Surveillance and Monitoring of Animal Tuberculosis, S., 2011. *Mycobacterium caprae* infection in livestock and wildlife, Spain. *Emerging Infectious Diseases*. 17 (3): 532–535. <https://doi.org/10.3201/eid1703.100618>.
- Rosell, C., Navàs, F., Romero, S., 2012. Reproduction of wild boar in a cropland and coastal wetland area: implications for management. *Animal Biodiversity and Conservation*. 35 (2): 209–220.
- Roy, A., Díez-Guerrier, A., Ortega, J., de la Cruz, M.L., Sáez, J.L., Domínguez, L., de Juan, L., Álvarez, J., Bezos, J., 2019. 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. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.11.025>.
- Roy, Á., Infantes-Lorenzo, J.A., Blázquez, J.C., Venteo, Á., Mayoral, F.J., Domínguez, M., Moreno, I., Romero, B., de Juan, L., Grau, A., Domínguez, L., Bezos, J., 2018a. Temporal analysis of the interference caused by paratuberculosis vaccination on the tuberculosis diagnostic tests in goats. *Preventive Veterinary Medicine*. 156 : 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.05.010>.
- Roy, Á., Rivalde, M.A., Bezos, J., Casal, C., Romero, B., Sevilla, I., Díez-Guerrier, A., Rodríguez-Bertos, A., Domínguez, M., Garrido, J., Gortázar, C., Domínguez, L., 2018b. Response of goats to intramuscular vaccination with heat-killed *Mycobacterium bovis* and natural challenge. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 60 : 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2018.09.006>.
- Roy, A., Rivalde, M.A., Casal, C., Romero, B., de Juan, L., Menshaw, A.M., Díez-Guerrier, A., Juste, R.A., Garrido, J.M., Sevilla, I.A., Gortazar, C., Domínguez, L., Bezos, J., 2017. Oral Vaccination with Heat-Inactivated *Mycobacterium bovis* Does Not Interfere with the Antemortem Diagnostic Techniques for Tuberculosis in Goats. *Frontiers in veterinary science*. 4 : 124. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00124>.
- Sáez-Royuela, C., Tellería, J.L., 1986. The increased population of the Wild Boar (*Sus scrofa* L.) in Europe. *Mammal Review*. 16 (2): 97–101. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2907.1986.tb00027.x>.
- Saito, M., Koike, F., Momose, H., Mihira, T., Uematsu, S., Ohtani, T., Sekiyama, K., 2012. Forecasting the range expansion of a recolonising wild boar *Sus scrofa* population. *Wildlife Biology*. 18 (4): 383–392. <https://doi.org/10.2981/11-110>.
- Salguero, F.J., Gibson, S., Garcia-Jimenez, W., Gough, J., Strickland, T.S., Vordermeier, H.M., Villarreal-Ramos, B., 2017. Differential Cell Composition and Cytokine Expression Within Lymph Node Granulomas from BCG-Vaccinated and Non-vaccinated Cattle Experimentally Infected with *Mycobacterium bovis*. *Transboundary and Emerging Diseases*. 64 (6): 1734–1749. <https://doi.org/10.1111/tbed.12561>.
- Santos, N., Almeida, V., Gortazar, C., Correia-Neves, M., 2015a. Patterns of *Mycobacterium tuberculosis*-complex excretion and characterization of super-shedders in naturally-infected wild boar and red deer. *Veterinary Research*. 46 (1): 129. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0270-4>.
- Santos, N., Correia-Neves, M., Almeida, V., Gortazar, C., 2012. Wildlife Tuberculosis: A Systematic Review of the Epidemiology in Iberian Peninsula, in: *Epidemiology Insights*. p. 24. <https://doi.org/10.5772/33781>.
- Santos, N., Correia-Neves, M., Ghebremichael, S., Källenius, G., Svenson, S.B., Almeida, V., 2009. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in wild boar (*Sus scrofa*) from Portugal. *Journal of Wildlife Diseases*. 45 (4): 1048–1061. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-45.4.1048>.

- Santos, N., Galdes, M., Afonso, A., Almeida, V., Correia-Neves, M., 2010. Diagnosis of tuberculosis in the wild boar (*Sus scrofa*): a comparison of methods applicable to hunter-harvested animals. PLoS ONE. 5 (9): e12663.
- 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. <https://doi.org/10.3201/eid2412.171357>.
- Santos, N., Santos, C., Valente, T., Gortázar, C., Almeida, V., Correia-Neves, M., 2015b. Widespread environmental contamination with *Mycobacterium tuberculosis* complex revealed by a molecular detection protocol. PLoS ONE. 10 (11): e0142079. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142079>.
- Santos, J.P. V., 2015. Ecology and physical condition of red deer in the Iberian Peninsula: implications for management. PhD Thesis. University of Aveiro.
- Santos, J.P. V., Acevedo, P., Carvalho, J., Queirós, J., Villamuelas, M., Fonseca, C., Gortázar, C., López-Olvera, J.R., Vicente, J., 2018a. The importance of intrinsic traits, environment and human activities in modulating stress levels in a wild ungulate. Ecological Indicators. 89 : 706–715. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.02.047>.
- Santos, J.P. V., Fernández-De-Mera, I.G., Acevedo, P., Boadella, M., Fierro, Y., Vicente, J., Gortázar, C., 2013. Optimizing the sampling effort to evaluate body condition in ungulates: A case study on red deer. Ecological Indicators. 30 : 65–71. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2013.02.007>.
- Santos, J.P. V., Vicente, J., Carvalho, J., Queirós, J., Villamuelas, M., Albanell, E., Acevedo, P., Gortázar, C., López-Olvera, J.R., Fonseca, C., 2018b. Determining changes in the nutritional condition of red deer in Mediterranean ecosystems: Effects of environmental, management and demographic factors. Ecological Indicators. 87 : 261–271. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.12.039>.
- Santos, J.P. V., Vicente, J., Villamuelas, M., Albanell, E., Serrano, E., Carvalho, J., Fonseca, C., Gortázar, C., López-Olvera, J.R., 2014. Near infrared reflectance spectroscopy (NIRS) for predicting glucocorticoid metabolites in lyophilised and oven-dried faeces of red deer. Ecological Indicators. 45 : 522–528. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.05.021>.
- Schley, L., Roper, T.J., 2003. Diet of wild boar *Sus scrofa* in Western Europe, with particular reference to consumption of agricultural crops. Mammal Review. 33 (1): 43–56. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2907.2003.00010.x>.
- Scillitani, L., Monaco, A., Toso, S., 2010. Do intensive drive hunts affect wild boar (*Sus scrofa*) spatial behaviour in Italy? Some evidences and management implications. European Journal of Wildlife Research. 56 (3): 307–318. <https://doi.org/10.1007/s10344-009-0314-z>.
- Serrano, M., Elguezabal, N., Garrido, J.M., Sevilla, I.A., Geijo, M. V., Molina, E., Juste, R.A., 2017a. Preliminary Results Indicate That Inactivated Vaccine against Paratuberculosis Could Modify the Course of Experimental *Mycobacterium bovis* Infection in Calves. Frontiers in Veterinary Science. 4 : 175. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00175>.
- Serrano, M., Elguezabal, N., Sevilla, I.A., Geijo, M. V., Molina, E., Arrazuria, R., Urkitza, A., Jones, G.J., Vordermeier, M., Garrido, J.M., Juste, R.A., 2017b. Tuberculosis detection in paratuberculosis vaccinated calves: New alternatives against interference. PLoS ONE. 12 (1): e0169735. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169735>.

- Serrano, M., Sevilla, I.A., Fuertes, M., Geijo, M., Risalde, M.Á., Ruiz-Fons, J.F., Gortazar, C., Juste, R.A., Domínguez, L., Elguezabal, N., Garrido, J.M., 2018. Different lesion distribution in calves orally or intratracheally challenged with *Mycobacterium bovis*: Implications for diagnosis. *Veterinary Research*. 49 (1): 74. <https://doi.org/10.1186/s13567-018-0566-2>.
- Sevilla, I.A., Molina, E., Elguezabal, N., Pérez, V., Garrido, J.M., Juste, R.A., 2015. Detection of mycobacteria, *Mycobacterium avium* subspecies, and *Mycobacterium tuberculosis* complex by a novel tetraplex real-time PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/JCM.03168-14>.
- Sevilla, I.A., Molina, E., Tello, M., Elguezabal, N., Juste, R.A., Garrido, J.M., 2017. Detection of Mycobacteria by Culture and DNA-Based Methods in Animal-Derived Food Products Purchased at Spanish Supermarkets. *Frontiers in Microbiology*. 8 : 1030. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01030>.
- Singhla, T., Boonyayatra, S., Punyapornwithaya, V., VanderWaal, K.L., Álvarez, J., Sreevatsan, S., Phornwisetsirikun, S., Sankwan, J., Srijun, M., Wells, S.J., 2017. Factors Affecting Herd Status for Bovine Tuberculosis in Dairy Cattle in Northern Thailand. *Veterinary Medicine International*. 2964389. <https://doi.org/10.1155/2017/2964389>.
- Skinner, M.A., Buddle, B.M., Wedlock, D.N., Keen, D., De Lisle, G.W., Tascon, R.E., Candido, J.F., Lowrie, D.B., Cockle, P.J., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., 2003. A DNA prime-*Mycobacterium bovis* BCG boost vaccination strategy for cattle induces protection against bovine tuberculosis? *Infection and Immunity*. 71 (9): 4901–4907. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.9.4901-4907.2003>.
- Smit, C., Putman, R., 2011. Large herbivores as ‘environmental engineers,’ in: Putman, R., Apollonio, M., Andersen, R. (Eds.), *Ungulate Management in Europe*. Cambridge University Press, Cambridge, UK. <https://doi.org/10.1017/cbo9780511974137.010>.
- Šprem, N., Piria, M., Prdun, S., Novosel, H., Treer, T., 2015. Variation of wild boar reproductive performance in different habitat types: Implications for management. *Russian Journal of Ecology*. 47 (1): 96–103. <https://doi.org/10.1134/S106741361506017X>.
- Tanner, E., White, A., Lurz, P., Gortázar, C., Díez-Delgado, I., Boots, M., 2018. The critical role of infectious disease in compensatory population growth in response to culling. *American Naturalist*. In press.
- Tato, A., 1999. Infecciones por *Mycobacterium* spp. en animales salvajes en la provincia de Cáceres. PhD. Thesis. Tesis doctoral. Universidad de Extremadura. Departamento de Sanida.
- 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., 2019a. 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. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.11.004>.
- Thomas, J., Infantes-Lorenzo, J.A., Moreno, I., Romero, B., Garrido, J.M., Juste, R., Domínguez, M., Domínguez, L., Gortazar, C., Risalde, M.A., 2019b. A new test to detect antibodies against *Mycobacterium tuberculosis* complex in red deer serum. *Veterinary Journal*. 244 : 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.12.021>.
- Thomas, J., Risalde, M.Á., Serrano, M., Sevilla, I., Geijo, M., Ortíz, J.A., Fuertes, M., Ruíz-Fons, J.F., de la Fuente, J., Domínguez, L., Juste, R., Garrido, J., Gortázar, C., 2017. The response of red deer to oral administration of heat-inactivated *Mycobacterium bovis* and challenge with a field strain. *Veterinary Microbiology*. 208 : 195–202. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.08.007>.

- Tolon, V., Dray, S., Loison A., Zeileis, A., Fische, C., Baubet, E., 2009. Responding to spatial and temporal variations in predation risk: space use of a game species in a changing landscape of fear. *Canadian Journal of Zoology*. 87 (12): 1129–1137. <https://doi.org/10.1139/Z09-101>.
- Torres-Porras, J., Carranza, J., Pérez-González, J., Mateos, C., Alarcos, S., 2014. The tragedy of the commons: unsustainable population structure of Iberian red deer in hunting estates. *European Journal of Wildlife Research*. 60 (2): 351–357. <https://doi.org/10.1007/s10344-013-0793-9>.
- Torres, R.T., Brotas, G., Fonseca, C., 2018. Roe deer (*Capreolus capreolus*) reintroduction in central Portugal: a tool for the Iberian wolf (*Canis lupus signatus*) conservation, in: Soorae, P.S. (Ed.), *Global Reintroduction Perspectives: Case Studies from around the Globe*. IUCN/SSC Reintroduction Specialist Group, Gland, Switzerland and Environment Agency.
- Torres, R.T., Carvalho, J., Fonseca, C., Serrano, E., López-Martín, J.M., 2016. Long term assessment of roe deer reintroductions in North East Spain: A case of success. *Mammalian Biology*. 81 (4): 415–422.
- Torres, R.T., Miranda, J., Carvalho, J., Fonseca, C., 2015. Expansion and current status of roe deer (*Capreolus capreolus*) at the edge of its distribution in Portugal. *Annales Zoologici Fennici*. 52 : 339–352.
- Torres, R.T., Santos, J., Linnell, J.D.C., Virgós, E., Fonseca, C., 2011. Factors affecting roe deer occurrence in a Mediterranean landscape, Northeastern Portugal. *Mammalian Biology*. 76 (4): 491–497. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2010.10.013>.
- Torres, R.T., Virgós, E., Santos, J., Linnell, J.D.C., Fonseca, C., 2012. Habitat use by sympatric red and roe deer in a Mediterranean ecosystem. *Animal Biology*. 62 (3): 351–366. <https://doi.org/10.1163/157075612X631213>.
- Treves, A., Wallace, R.B., Naughton-Treves, L., Morales, A., 2006. Co-managing human–wildlife conflicts: A review. *Human Dimensions of Wildlife*. 11 (6): 383–396. <https://doi.org/10.1080/10871200600984265>.
- Triguero-Ocaña, R., Barasona, J.A., Carro, F., Soriguer, R.C., Vicente, J., Acevedo, P., 2019. Spatio-temporal trends in the frequency of interspecific interactions between domestic and wild ungulates from Mediterranean Spain. *PLoS ONE*. 14 (1): e0211216. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211216>.
- Valente, A., Valente, J., Fonseca, C., Torres, R., 2017. The success of species reintroductions: A case study of red deer in Portugal two decades after reintroduction. *International Journal of Biodiversity Science, Ecosystem Services and Management*. 13 (1): 134–138. <https://doi.org/10.1080/21513732.2016.1277265>.
- Valente, A.M., Fonseca, C., Marques, T.A., Santos, J.P., Rodrigues, R., Torres, R.T., 2014. Living on the edge: Roe deer (*Capreolus capreolus*) density in the margins of its geographical range. *PLoS ONE*. 9 (2): e8845. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088459>.
- Valente, A.M., Marques, T.A., Fonseca, C., Torres, R.T., 2016. A new insight for monitoring ungulates: density surface modelling of roe deer in a Mediterranean habitat. *European Journal of Wildlife Research*. 62 (5): 577–587. <https://doi.org/10.1007/s10344-016-1030-0>.
- Vallejo, R., García Marín, J.F., Juste, R.A., Muñoz-Mendoza, M., Salguero, F.J., Balseiro, A., 2018. Immunohistochemical characterization of tuberculous lesions in sheep naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *BMC Veterinary Research*. 14 (1): 154. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1476-2>.
- VanderWaal, K., Enns, E.A., Picasso, C., Álvarez, J., Pérez, A., Fernández, F., Gil, A., Craft, M., Wells, S., 2017. Optimal surveillance strategies for bovine tuberculosis in a low-prevalence country. *Scientific Reports*. 7 (1): 4140. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04466-2>.

- VanderWaal, K.L., Picasso, C., Enns, E.A., Craft, M.E., Álvarez, J., Fernández, F., Gil, A., Pérez, A., Wells, S., 2016. Network analysis of cattle movements in Uruguay: Quantifying heterogeneity for risk-based disease surveillance and control. *Preventive Veterinary Medicine*. 123 : 12–22. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.12.003>.
- Veeroja, R., Männil, P., 2014. Population development and reproduction of wild boar (*Sus Scrofa*) in Estonia. *Wildlife Biology in Practice*. 10 (3): 17–21. <https://doi.org/10.2461/wbp.2014.un.3>.
- Vetter, S.G., Ruf, T., Bieber, C., Arnold, W., 2015. What is a mild winter? Regional differences in within-species responses to climate change. *PLoS ONE*. 10 (7): e0132178. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132178>.
- Vicente, J., Barasona, J.A., Acevedo, P., Ruiz-Fons, J.F., Boadella, M., Diez-Delgado, I., Beltran-Beck, B., González-Barrio, D., Queirós, J., Montoro, V., de la Fuente, J., Gortazar, C., 2013. Temporal trend of tuberculosis in wild ungulates from mediterranean Spain. *Transboundary and Emerging Diseases*. 60 (Suppl 1): 92–103. <https://doi.org/10.1111/tbed.12167>.
- Vicente, J., Hofle, U., Garrido, J.M., Fernández-de-Mera, I.G., Acevedo, P., Juste, R., Barral, M., Gortazar, C., 2007. Risk factors associated with the prevalence of tuberculosis-like lesions in fenced wild boar and red deer in south central Spain. *Veterinary Research*. 38 (3): 451–464. <https://doi.org/10.1051/vetres:2007002v07069> [pii].
- Vidal, E., Arrieta-Villegas, C., Grasa, M., Mercader, I., Domingo, M., Pérez de Val, B., 2017. Field evaluation of the efficacy of *Mycobacterium bovis* BCG vaccine against tuberculosis in goats. *BMC Veterinary Research*. 13 (1): 252.
- Vidal, E., Grasa, M., Perálvarez, T., Martín, M., Mercader, I., Pérez de Val, B., 2018a. Transmission of tuberculosis caused by *Mycobacterium caprae* between dairy sheep and goats. *Small Ruminant Research*. 158 : 22–25. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.11.010>.
- Vidal, E., Mercader, I., Martín, M., Cervera, Z., Espinar, S., Soler, M., Allepuz, A., Pérez de Val, B., 2018b. Tuberculosis outbreak in Montseny Natural Park involving free-ranging wild boar and domestic goats, in: 13th European Wildlife Disease Association Conference. Larissa (Greece), p. 159.
- Vieira-Pinto, M., 2005. Inspeção Higió-Sanitária de Caça Selvagem. *Epidemiologia de algumas doenças*.
- Vieira-Pinto, M., 2008. Manual de Exame Inicial de Caça abatida em Zonas de Caça. Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.
- Vieira-Pinto, M., 2014. Game meat hygiene and safety in Portugal. Section 3 Hygiene in game meat production and associated legislation, in: Paulsen, P., Bauer, A., Smulders, F.J.M. (Eds.), *Trends in Game Meat Hygiene: From Forest to Fork*. Wageningen Academic Publishers, pp. 223–240.
- Vieira-Pinto, M., 2016. Capítulo XIV. Sanidade e higiene em animais selvagens e segurança alimentar, in: *Manual Para Exame Carta de Caçador*. ICNF, Lisboa, Portugal, pp. 99–113.
- Vieira-Pinto, M., 2017. Wild fauna diseases under One Health approach: The example of large game in Portugal, in: *Xth International Symposium on Wildlife*. Vila Real, Portugal, p. 41. <https://doi.org/978-989-704-245-4>.

- Vieira-Pinto, M., Alberto, J., Aranha, J., Serejo, J., Canto, A., Cunha, M. V., Botelho, A., 2011. Combined evaluation of bovine tuberculosis in wild boar (*Sus scrofa*) and red deer (*Cervus elaphus*) from Central-East Portugal. *European Journal of Wildlife Research*. 57 (6): 1189–1201. <https://doi.org/10.1007/s10344-011-0532-z>.
- Vieira-Pinto, M., Gonçalves, R., Serejo, J., Caiola, L., Manteigas, A., Aranha, J., 2015. Relationship between livestock farms and large game regarding the presence of bovine tuberculosis – a spatio-temporal approach, in: IX International Symposium on Wild Fauna. Kosice, Slovakia, pp. 153–155.
- von Essen, E., 2019. How Wild Boar Hunting Is Becoming a Battleground. *Leisure Sciences*.
- Vordermeier, H.M., Jones, G.J., Buddle, B.M., Hewinson, R.G., 2016. Development of immune-diagnostic reagents to diagnose bovine tuberculosis in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 181 : 10–14. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.02.003>.
- Wangoo, A., Johnson, L., Gough, J., Ackbar, R., Inglut, S., Hicks, D., Spencer, Y., Hewinson, G., Vordermeier, M., 2005. Advanced granulomatous lesions in *Mycobacterium bovis*-infected cattle are associated with increased expression of type I procollagen, gammadelta (WC1+) T cells and CD 68+ cells. *Journal of Comparative Pathology*. 133 (4): 223–234. [https://doi.org/S0021-9975\(05\)00063-0](https://doi.org/S0021-9975(05)00063-0) [pii]10.1016/j.jcpa.2005.05.001.
- Waters, W.R., Palmer, M. V., Buddle, B.M., Vordermeier, H.M., 2012. Bovine tuberculosis vaccine research: Historical perspectives and recent advances. *Vaccine*. 30 (16): 2611–2622. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.02.018>.
- Waters, W.R., Palmer, M. V., Nonnecke, B.J., Thacker, T.C., Scherer, C.F.C., Estes, D.M., Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M., Barnes, S.W., Federe, G.C., Walker, J.R., Glynne, R.J., Hsu, T., Weinrick, B., Biermann, K., Larsen, M.H., Jacobs, W.R., 2009. Efficacy and immunogenicity of *Mycobacterium bovis* Δ RD1 against aerosol *M. bovis* infection in neonatal calves. *Vaccine*. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.12.018>.
- Waters, W.R., Palmer, M. V., Nonnecke, B.J., Thacker, T.C., Scherer, C.F.C., Estes, D.M., Jacobs, W.R., Glatman-Freedman, A., Larsen, M.H., 2007. Failure of a *Mycobacterium tuberculosis* Δ RD1 Δ panCD double deletion mutant in a neonatal calf aerosol *M. bovis* challenge model: Comparisons to responses elicited by *M. bovis* bacille Calmette Guerin. *Vaccine*. 25 (45): 7832–7840. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.08.029>.
- Wedlock, D.N., Aldwell, F.E., Keen, D., Skinner, M.A., Buddle, B.M., 2005. Oral vaccination of brushtail possums (*Trichosurus vulpecula*) with BCG: Immune responses, persistence of BCG in lymphoid organs and excretion in faeces. *New Zealand Veterinary Journal*. 53 (5): 301–306. <https://doi.org/10.1080/00480169.2005.36564>.

LISTADO DE PARTICIPANTES

Grupos Científicos

Grupo de Investigación en Sanidad Animal de la Universidad de Córdoba (www.uco.es)

David Cano Terriza, davidcanovet@gmail.com

Ignacio García Bocanegra, nacho.garcia@uco.es

Javier Caballero Gómez, javiercaballero15@gmail.com

Jorge Paniagua Risueño, jorgepaniaguarisueno@gmail.com

María de los Ángeles Risalde Moya, v12rimom@uco.es

Saúl Jiménez Ruiz, saul.jimenez.ruiz@gmail.com

Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA) (www.serida.org); Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria de la Universidad de León (www.unileon.es)

Ana Balseiro, abalm@unileon.es

Cristina Blanco Vázquez, cristina.blancovazquez@serida.org

José Miguel Prieto, jmprieto@serida.org

Ramón A. Juste, rajuste@serida.org

INIAV, I.P. - Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, Unidade Estratégica de Investigação e Serviços em Produção e Saúde Animal (www.iniaiv.pt)

Ana Botelho, ana.botelho@iniaiv.pt

Ana C. Reis, ana.reis714@gmail.com

André Pereira, andre.c.pereira94@gmail.com

Mónica V. Cunha, monica.cunha@iniaiv.pt

Sandra Cavaco, sandra.cavaco@iniaiv.pt

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

Inmaculada Moreno Iruela, imoreno@isciii.es

José Antonio Infantes Lorenzo, ja.infantes@ucm.es

Mercedes Domínguez Rodríguez, mdominguez@isciii.es

Grupo de Epidemiología del Departament de Sanitat i Anatomia Animals (Facultat de Veterinària, UAB) y del Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA-IRTA). Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) (www.uab.cat)

Alberto Allepuz, alberto.allepuz@uab.cat

Giovanna Ciaravino, giovanna.ciaravino@uab.cat

Jordi Casal i Fàbrega, jordi.casal@uab.cat

Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), Institut de Recerca y tecnología Agroalimentàries (IRTA) (www.cresa.cat; www.irta.cat)

Bernat Pérez de Val, bernat.perez@irta.cat

Claudia Arrieta Villegas, claudia.arrieta@irta.cat

Enric Vidal Barba, enric.vidal@irta.cat

Maite Martín Fernández maite.martin@irta.cat

Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (NEIKER) (www.neiker.net)

Iker A. Sevilla, isevilla@neiker.eus

Joseba Garrido, jgarrido@neiker.eus

Marta Barral, mbarral@neiker.eus

Lucía Varela, lvarela@neiker.eus

CIBIO – Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos da Universidade do Porto; InBIO – Rede de Investigação em Biodiversidade e Biologia Evolutiva (cibio.up.pt)

João Queirós, joao.queiros@cibio.up.pt

Nuno Santos, nuno.santos@cibio.up.pt

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

Ana Carolina Abrantes, carolina.pasca@gmail.com

Madalena Vieira-Pinto, mmvpinto@utad.pt

Miguel Ângelo Carvalho, messmessi@hotmail.com

Departamento de Biologia & CESAM, Universidade de Aveiro, (www.ua.pt; www.cesam.ua.pt)

Ana Valente, anamvalente@ua.pt

Carlos Fonseca, cfonseca@ua.pt

João Carvalho, jlocarvalho@gmail.com

Rita Tinoco Torres, rita.torres@ua.pt

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

Marisa Ana Andrada, marisaana.andrada@ulpgc.es

European Union Reference Laboratory for Bovine Tuberculosis (EU-RL) (www.visavet.es/bovinetuberculosis/)

Beatriz Romero Martínez, bromerom@visavet.ucm.es

Javier Bezos Garrido, jbezosg@visavet.ucm.es

Lucía de Juan Ferré, dejuan@visavet.ucm.es

Grupo de Investigación en Sanidad y Biotecnología (SaBio), Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos IREC (Universidad de Castilla – La Mancha y CSIC) (www.irec.es)

Carmen Ruíz Rodríguez, carmenruizrodriguez1@gmail.com

Christian Gortázar, christian.gortazar@uclm.es

Eduardo Laguna Fernández, eduardolagunafernandez@gmail.com

Joaquín Vicente Baños, joaquin.vicente@uclm.es

Patricia Barroso Seano, pbarrososgg@gmail.com

Saúl Jiménez Ruiz, sauljimenezruiz@gmail.com

Grupo de Investigación del Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET), Universidad Complutense de Madrid (UCM) (www.visavet.es)

Álvaro Roy, alvaro.roy@ucm.es

Javier Ortega, javior02@ucm.es

Julio Álvarez, jalvarez@visavet.ucm.es

Lucas Domínguez, lucasdo@visavet.ucm.es

Pilar Pozo, ppoza@ucm.es

Grupo de Investigación de Patología Infecciosa Veterinaria (PATIN), Red de Grupos de Investigación en Recursos Faunísticos de la UEX (GRINREF-UEX)

Alfredo García Sánchez (CICYTEX), fredgarsa@gmail.com

Javier Galapero Arroyo, jagaar@unex.es

Javier Hermoso de Mendoza Salcedo, jhermoso@unex.es

José Manuel Benítez Medina, jmbenimed@unex.es

Luis Gómez Gordo, luih@unex.es

Remigio Martínez Pérez, remimar@unex.es

Lidia Balibrea Zúñiga, libalibreaz@unex.es

Natalia Jiménez Pizarro, nataliajp@unex.es

Universidad Complutense de Madrid

Alicia Aranaz Martín, alaranaz@vet.ucm.es

Universidad de Extremadura

Javier Pérez González, jpergon@unex.es

Administración

Área de Ganadería. Comunidad de Madrid

Carlos Fernández Zapata, carlos.fernandezzz@madrid.org

Consejería de Agricultura, Ganadería, Pesca y Desarrollo Sostenible Junta de Andalucía

Ángel Camacho Carrasco, angelj.camacho@juntadeandalucia.es

Manuel Fernández Morente, manuel.fernandez.morente@juntadeandalucia.es

Consejería de Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación de Cantabria

Maria Bodega Zugasti, bodega_m@cantabria.es

Consejería de Medio Ambiente, Agricultura y Pesca Illes Balears

Amadeo Vázquez Massot, avazquez@dgagric.caib.es

Direcção Geral de Alimentação e Veterinária

María José Calixto, mjose.calixto@dgav.pt

Yolanda Vaz, yolanda.vaz@dgav.pt

Generalitat Valenciana

Alfredo Fernando Gala Vela, gala_alf@gva.es

Gobierno de Aragón

Joaquín Hermosilla Cabrerizo, jhermosilla@aragon.es

Gobierno de Navarra

César Fernández Salinas, cfernans@navarra.es

David Navarro Caspistegui, david.navarro.caspistegui@navarra.es

Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha

Manuel Jaime Capilla Gonzalez, jcapilla@jccm.es

Marta Vigo Martín, mvigo@jccm.es

Junta de Castilla y León

Anna Grau Vila, gravilan@jcyl.es

Juan Carlos Blázquez, blasanju@jcyl.es

Olga Minguez González, mingonol@jcyl.es

Junta de Extremadura

Cristina Sanz Jiménez, cristina.sanz@juntaex.es

José Carlos Moreno Muñoz, josecarlos.moreno@juntaex.es

José Luis Cárdeno Vargas, joseluis.cardeno@juntaex.es

Inmaculada Montero, inmaculada.montero@juntaex.es

Aurelia Reyes Galán, aurelia.reyes@juntaex.es

Ana Grande Murillo, ana.grande@salud-juntaex.es

Juan Carlos Dominguez Vellarino, juan.dominguez@salud-juntaex.es

Laboratorio Central de Sanidad Animal de Santa Fe

María Jesús Ortega Sánchez, mosanchez@mapa.es

Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación

José Luis Sáez Llorente, jsaezll@mapa.es

María Soledad Collado Cortés, scollado@mapa.es

Xunta de Galicia

Jesús Javier Orejas Fernández, jesus.javier.orejas.fernandez@xunta.gal

Marta Muñoz Mendoza, marta.munoz.mendoza@xunta.es

Empresas

Alternativa TIC S.L.

Juan Manuel López García, lopez@alternativatic.com

Idexx

Ana Manso, ana-manso@idexx.com

Christian Schelp, Christian-Schelp@idexx.com

ID-VET, S.L.

Ignacio García Pastor, ignacio.garciapastor@id-vet.com

Loic Comtet, loic.comtet@id-vet.com

INGENASA

Ricardo García Arroyo, rgarcia.arroyo@ingenasa.com

Ángel Venteo, aventeo@ingenasa.com

INGULADOS

Pedro Fernández Llarío, pedro@ingulados.com

David Risco, david@ingulados.com

Thermo-Fisher Scientific

Gabriel Rodríguez-Alarcon, Gabriel.Rodriguez-Alarcon@thermofisher.com

TRAGSATEC S.A.,S.M.E.,M.P

José Carlos González Sánchez, jgonza21@tragsa.es

Luis Miguel Galindo Martínez, lgalindo@tragsa.es

Zoetis

Francisco Javier Serrano Marín, franciscojavier.serranomarin@zoetis.com

ANEXOS

I Workshop Ibérico y II Nacional de Investigación en Tuberculosis Animal 3-5 de abril de 2019, Cáceres

Organizan

Universidad de Extremadura, Consejería de Medio Ambiente y Rural, Políticas Agrarias y Territorio- Junta de Extremadura, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación- Gobierno de España, Ministério da Agricultura, Florestas e Desenvolvimento Rural- Governo de Portugal.

Recogida de documentación

Día 3 de abril, miércoles: 19:00-20:00 Acreditación de asistentes y recogida de documentación.

Día 4 de abril, jueves: 8:00-8:30 Acreditación de asistentes y recogida de documentación.

Comité Organizador

José Luis Sáez Llorente,

Área de Programas Sanitarios y Zoonosis, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación.

Yolanda Vaz,

Servicio de Protección Animal, Direcção Geral de Alimentação e Veterinária, Portugal.

Cristina Sanz Jiménez,

Dirección General de Agricultura y Ganadería, Consejería de Medio Ambiente y Rural, Políticas Agrarias y Territorio, Junta de Extremadura.

Javier Hermoso de Mendoza Salcedo,

Unidad de Patología Infecciosa, Departamento de Sanidad Animal, Universidad de Extremadura.

María Luisa Tello Sánchez,

Tecnologías y Servicios Agrarios, S.A., S.M.E., M.P. (TRAGSATEC S.A.,S.M.E.,M.P).

María Teresa Hernández Guerra,

Tecnologías y Servicios Agrarios, S.A., S.M.E., M.P. (TRAGSATEC S.A.,S.M.E.,M.P).

Comité Científico

Javier Hermoso de Mendoza Salcedo,

Unidad de Patología Infecciosa, Departamento de Sanidad Animal, Universidad de Extremadura.

José Manuel Benítez Medina,

Unidad de Patología Infecciosa, Departamento de Sanidad Animal, Universidad de Extremadura.

Remigio Martínez Pérez,

Unidad de Patología Infecciosa, Departamento de Sanidad Animal, Universidad de Extremadura.

Ana Balseiro Morales,

Unidad de Histología y Anatomía Patológica, Departamento de Sanidad Animal, Universidad de León.

Ana Botelho,

Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária, I.P., Portugal.

PROGRAMA

Día 4 de abril, jueves

- 8:30-9:00 Bienvenida, inauguración oficial y presentación del programa del Workshop:
José Manuel Fuentes Rodríguez, Adjunto al Vicerrector de Investigación de la UEX
Rosario Cordero Martín, Presidenta de la Diputación de Cáceres
Begoña García Bernal, Consejera de Medio Ambiente, Rural Políticas Agrarias y Territorio
Yolanda García Seco, Delegada del Gobierno en Extremadura
- 9:00-9:30 **Ponencia Dr. Javier Salguero Bodes**, Public Health England, UK. *Vacunas frente a tuberculosis animal*
- 9:30-9:50 Discusión Ponencia

BLOQUE DE PRESENTACIONES DE LOS GRUPOS DE INVESTIGACIÓN EN TB DE ESPAÑA Y PORTUGAL

- 9:50-10:05 Grupo de Investigación AGR-149. Universidad de Córdoba:
Presentación del grupo. Pasado, presente, futuro, colaboraciones
- 10:05-10:20 Grupo de Investigación SERIDA-Universidad de León
Presentación del grupo. Pasado, presente, futuro, colaboraciones
- 10:20-10:35 Grupo de Investigación INIAV, IP, Portugal
Presentación del grupo. Pasado, presente, futuro, colaboraciones
- 10:35-10:50 Grupo de Investigación Instituto de Salud Carlos III
Presentación del grupo. Pasado, presente, futuro, colaboraciones
- 10:50-11:05 Grupo de Investigación UAB
Presentación del grupo. Pasado, presente, futuro, colaboraciones
- 11:05-11:30 Pausa café
- 11:30-12:00 **Ponencia Dr. Douwe Bakker**, Lelystad. “*Tests diagnósticos para la tuberculosis bovina*” (“*Diagnostic tests for bovine tuberculosis: the tuberculin skintest.*”)
- 12:00-12:20 Discusión Ponencia
- 12:20-12:35 Grupo de Investigación CReSA-IRTA
Presentación del grupo. Pasado, presente, futuro, colaboraciones
- 12:35-12:50 Grupo de Investigación NEIKER- Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario
Presentación del grupo. Pasado, presente, futuro, colaboraciones
- 12:50-13:05 Grupo de Investigación CIBIO, Universidades do Porto
Presentación del grupo. Pasado, presente, futuro, colaboraciones
- 13:05-13:20 Grupo de Investigación Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD)
Presentación del grupo. Pasado, presente, futuro, colaboraciones
- 13:20-13:35 Grupo de Investigación Universidade de Aveiro.
Presentación del grupo. Pasado, presente, futuro, colaboraciones

- 13:35-13:50 Grupo de Investigación ULPGC-Instituto Universitario de Sanidad Animal y Seguridad Alimentaria
Presentación del grupo. Pasado, presente, futuro, colaboraciones
- 13:50-14:05 Grupo de Investigación European Union Reference Laboratory for Bovine Tuberculosis (EURL)
Presentación del grupo. Pasado, presente, futuro, colaboraciones
- 14:05-16:30 Almuerzo de trabajo
- 16:30-17:00 **Ponencia Dr. Oliver Keuling**, Universidad de Hannover. “*Gestión del jabalí para un control poblacional y sanitario: un enfoque europeo.*” (“*Wild boar management for population and sanitary control: an european perspective.*”)
- 17:00-17:15 Discusión ponencia
- 17:15-17:30 Grupo de Investigación IREC-UCLM
Presentación del grupo. Pasado, presente, futuro, colaboraciones
- 17:30-17:45 Grupo de Investigación Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria VISAVET
Presentación del grupo. Pasado, presente, futuro, colaboraciones
- 17:45-18:00 Grupo de Investigación PATIN-UEX
Presentación del grupo. Pasado, presente, futuro, colaboraciones
- 18:00 -21:00 Tiempo libre/Visita Guiada Ciudad Monumental
- 21:00 Cena

Día 5 de abril, viernes

- 9:00-10:00 **Ponencias de Yolanda Vaz y José Luis Sáez.** “*Los nuevos retos derivados de la nueva legislación comunitaria en Sanidad Animal para la investigación en el CMTB.*” “*Puntos críticos a los que se enfrenta la administración en la erradicación de la tuberculosis*”
- 10:00-10:15 Discusión ponencia
- 10:15-10:30 **Constitución mesas de trabajo**
- 10:30-11:00 Descanso / Café
- 11:00-13:00 **Mesas Redondas**

MESA 1: BIOSEGURIDAD Y POTENCIACIÓN INMUNITARIA

Moderadora: Marta Vigo Martín

Secretario: José Carlos Moreno Muñoz

Guión: Contención/segregación, medidas de control en áreas abiertas; alimentación/nutrición; control de la inmunosupresión en ganado y en especies cinegéticas: impacto de la malnutrición y de agentes biológicos; autovacunas

MESA 2: AVANCES EN DIAGNÓSTICO, MEJORAS EN LAS TÉCNICAS VIGENTES

Moderadora: Ana Botelho

Secretaria: Beatriz Romero Martínez

Guion: Tuberculina; gamma-interferón (nuevos péptidos, puntos de corte, kits en desarrollo); Fagos; ELISA; PCR directa en muestra; discriminación entre TB y otras micobacteriosis

MESA 3: EPIDEMIOLOGÍA: CÓMO APROVECHAR LA INFORMACIÓN EXISTENTE

Moderadora: Olga Mínguez González

Secretario: Fernando Boinas

Guion: Elaboración de estudios epidemiológicos eficaces, diseño de encuestas en granja, epidemiología molecular, Sistemas de Información Geográfica y bases de datos, análisis de riesgos

MESA 4: PUNTOS CRÍTICOS PARA EL CONTROL DE LA TUBERCULOSIS

Moderador: César Fernández Salinas

Secretaria: Marta Muñoz Mendoza

Guion: Interacciones con otras especies domésticas, fraudes diagnósticos, estudios sociológicos y comunicación entre actores implicados

- 13:00-14:00 Lectura de conclusiones y turno de preguntas y comentarios de los asistentes que representan a las asociaciones, empresas, entidades colegiales y administraciones relacionados con la Tuberculosis animal
- 14:00 - 14:15 Clausura
- 14:15 17:00 Almuerzo de trabajo y despedida



I WORKSHOP IBÉRICO Y II NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN TUBERCULOSIS ANIMAL

4 Y 5 DE ABRIL DE 2019, CÁCERES

Organiza

JUNTA DE EXTREMADURA

Consejería de Medio Ambiente y Rural,
Políticas Agrarias y Territorio



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE AGRICULTURA, PESCA,
Y ALIMENTACIÓN



Colabora



IDEXX



:CZ VACCINES

ID.vet

**ThermoFisher
SCIENTIFIC**

zoetis

IG TEGASA

INGENASA

