



Tuberculosis animal

Una aproximación desde la perspectiva de la ciencia y la administración

La tuberculosis ha acompañado al ser humano y a los animales a lo largo de toda su historia y evolución. Tras los descubrimientos de Koch, Calmette y Guérin y otros investigadores de finales del siglo XIX y principios de siglo XX, se iniciaron esquemas de control de la tuberculosis animal en el ganado bovino cuyas esencias permanecen prácticamente inalteradas bien avanzado el siglo XXI.

Hoy sigue estando de plena actualidad y ya no se entiende como una enfermedad bovina, sino como una enfermedad que afecta a un gran abanico de especies animales domésticas y silvestres, y por supuesto, al hombre.

Con este libro hemos querido recordar el camino recorrido desde el descubrimiento del patógeno causante de la tuberculosis hasta la actualidad, destacando los principales avances científicos realizados en el último lustro. España se encuentra a la cabeza de la investigación mundial de esta enfermedad, pero aún queda mucho camino por recorrer y se requerirán nuevas inversiones y reforzar las existentes en investigación y desarrollo.

Editores:

Ana Balseiro Morales

Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León (ULE);
Departamento de Sanidad Animal, Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-ULE).

Christian Gortázar Schmidt

SaBio, Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos IREC (CSIC-UCLM).

José Luis Sáez Llorente

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

Madrid, 2020



TUBERCULOSIS ANIMAL: UNA APROXIMACIÓN DESDE LA PERSPECTIVA DE LA CIENCIA Y LA ADMINISTRACIÓN

ANA BALSEIRO, CHRISTIAN GORTÁZAR Y JOSÉ LUIS SÁEZ

TUBERCULOSIS ANIMAL

UNA APROXIMACIÓN DESDE LA PERSPECTIVA DE LA CIENCIA Y LA ADMINISTRACIÓN

ANA BALSEIRO, CHRISTIAN GORTÁZAR Y JOSÉ LUIS SÁEZ

**Tuberculosis animal:
una aproximación desde la perspectiva
de la Ciencia y la Administración**

Editores:

Ana Balseiro Morales

Christian Gortázar Schmidt

José Luis Sáez Llorente

Edita: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA)

Editores: Ana Balseiro Morales, Christian Gortázar Schmidt y José Luis Sáez Llorente

Texto y fotografías: Autores

Diseño portada y contraportada: Sergio González (VISAVET)

Diseño y maquetación: José Manuel Fernández (Lloviendo letras)

ISBN: NIPO: Depósito Legal: M-25393-2019

Impreso en España - Printed in Spain

NIPO papel: 003200652

DL: M-15184-2020

NIPO línea: 003200668

Colaboradores

Allepuz, Alberto. IRTA-CReSA, Campus de Bellaterra, Barcelona; Universidad Autónoma de Barcelona, Campus de Bellaterra, Barcelona

Álvarez, Julio. VISAVET, Universidad Complutense de Madrid; Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid

Aranaz, Alicia. Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid

Balseiro, Ana. Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León, León; Departamento de Sanidad Animal, Instituto de Ganadería de Montaña (CSIC-Universidad de León), Finca Marzanas, Grulleros, León

Barral, Marta. NEIKER, Departamento de Sanidad Animal, Derio, Bizkaia

Barasona, José Ángel. VISAVET, Universidad Complutense de Madrid; Departamento de Sanidad Animal, Universidad Complutense de Madrid, Madrid

Benítez-Medina, José Manuel. Departamento de Sanidad Animal, Universidad de Extremadura, Cáceres

Bezós, Javier. VISAVET, Universidad Complutense de Madrid; Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid

Cano, David. Departamento de Sanidad Animal, Universidad de Córdoba, Córdoba

Carpio, Antonio. SaBio-IREC, Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real

Casal, Jordi. IRTA-CReSA, Campus de Bellaterra, Barcelona; Universidad Autónoma de Barcelona, Campus de Bellaterra, Barcelona

Ciaravino, Giovanna. Universidad Autónoma de Barcelona, Campus de Bellaterra, Barcelona

De Juan, Lucía. VISAVET, Universidad Complutense de Madrid; Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid

Díez, Alberto. VISAVET, Universidad Complutense de Madrid; Departamento de Sanidad Animal, Universidad Complutense de Madrid, Madrid

Domingo, Mariano. IRTA-CReSA, Campus de Bellaterra, Barcelona; Universidad Autónoma de Barcelona, Campus de Bellaterra, Barcelona

Domínguez, José. IGTP, CIBERES, Universidad Autónoma de Barcelona, Badalona, Barcelona

Domínguez, Lucas. VISAVET, Universidad Complutense de Madrid; Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid

García Bocanegra, Ignacio. Departamento de Sanidad Animal, Universidad de Córdoba, Córdoba

Garrido, Joseba. NEIKER, Departamento de Sanidad Animal, Derio, Bizkaia

González, David. SALUVET, Departamento de Sanidad Animal, Universidad Complutense de Madrid, Madrid

Gortázar, Christian. SaBio-IREC, Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real

Hermoso de Mendoza, Javier. Departamento de Sanidad Animal, Universidad de Extremadura, Cáceres

Infantes Lorenzo, José Antonio. Instituto de Salud Carlos III, Centro Nacional de Microbiología, Unidad de Inmunología Microbiana, Madrid

Jiménez Ruiz, Saúl. SaBio-IREC, Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real; Departamento de Sanidad Animal, Universidad de Córdoba, Córdoba

Juste, Ramón. NEIKER, Departamento de Sanidad Animal, Derio, Bizkaia; SERIDA, Villaviciosa

Lorente, Víctor. VISAVET, Universidad Complutense de Madrid; Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid

Marco, Alberto. Universidad Autónoma de Barcelona, Campus de Bellaterra, Barcelona

Martínez, Remigio. Departamento de Sanidad Animal, Universidad de Extremadura, Cáceres

Muñoz, Marta. Consellería do Medio Rural, Xunta de Galicia, Santiago de Compostela

Mínguez, Olga. Consejería de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural de la Junta de Castiálla y León, Valladolid

Moreno, Inmaculada. Instituto de Salud Carlos III, Centro Nacional de Microbiología, Unidad de Inmunología Microbiana, Madrid

Pérez de Val, Bernat. IRTA-CReSA, Campus de Bellatera, Barcelona

Picasso-Risso, Catalina. Department of Veterinary Population Medicine, College of Veterinary Medicine, University of Minnesota

Pozo, Pilar. VISAVET, Universidad Complutense de Madrid; MAEVA SERVET SL., Alameda del Valle, Madrid

Prieto, Miguel. SERIDA, Departamento de Sanidad Animal, Gijón

Risalde, M^a Ángeles. Universidad de Córdoba, Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, Córdoba

Rodríguez-Bertos, Antonio. VISAVET, Universidad Complutense de Madrid; Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid

Romero, Beatriz. VISAVET, Universidad Complutense de Madrid, Madrid

Roy, Álvaro. CZ Vaccines S.A., Porriño, Pontevedra; VISAVET, Universidad Complutense de Madrid, Madrid

Sáez, José Luis. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid

Salguero, Francisco Javier. Public Health England, Londres, Reino Unido

Sevilla, Iker A. NEIKER, Departamento de Sanidad Animal, Derio, Bizkaia

Thomas, Jobin. SaBio-IREC, Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real; Indian Council of Agricultural Research (ICAR), New Delhi, India

Vargas, Ignacio. VISAVET, Universidad Complutense de Madrid; Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, Madrid

Vicente, Joaquín. SaBio-IREC, Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real; ETSIA, Ciudad Real

Vidal, Enric. IRTA-CReSA, Campus de Bellatera, Barcelona

Prólogo

Encomendarme condensar en una página la presentación de un libro de esta extensión me hace sospechar que me encuentro en la edad en la que la duración de una carrera profesional ha podido generar unas expectativas de autoridad científica muy por encima de la real. En todo caso, personalmente agradezco la oportunidad de cerrar así el círculo que inicié hace casi 30 años con la publicación en la extinta *Hygia pecoris*, de una revisión que intentaba disipar las dudas que estaba generando la aplicación de la intradermorreacción al implantar la obligatoriedad del saneamiento en el País Vasco. Para aprovecharla, me gustaría empezar rindiendo homenaje a los colegas que me precedieron citando al menos a tres que, personalmente, me parecen más relevantes en mi relación con la tuberculosis bovina. El primero y de mayor importancia específica fue Jesús Cuezva Samaniego, al que ni siquiera conocí personalmente, pero que además de fundar el primer centro de referencia de tuberculosis bovina en Bilbao, donde yo he desarrollado la mayor parte de mi carrera profesional, realizó un increíble trabajo de investigación en campo en los años 50, que resultó, ya en 1966, en un libro que sigue siendo hoy día sólida y extensa referencia científica e histórica. El segundo, Miguel Cordero del Campillo, que con solo un roce pasajero con la tuberculosis, fue una insigne figura de la veterinaria española del siglo XX recientemente desaparecida y que, en 1964, percibiendo su importancia, dio credibilidad a la intradermorreacción con una documentada revisión para la profesión española. Y el tercero, José Manuel Goicoechea Ascorbe que, en su doble papel de veterinario y político, ya a principios de los 80, tuvo la visión y el empuje para, apoyándose en el peso ganadero del norte peninsular, anticipar a la Comunidad Autónoma del País Vasco en la puesta en marcha del programa de saneamiento de tuberculosis, que la entrada en la Unión Europea extendió al resto del estado.

En realidad, durante décadas, la tuberculosis venía recibiendo poca atención. La confianza generada por el éxito en la erradicación de la tuberculosis bovina en algunos países y por las medidas de seguridad alimentaria para prevenir la infección humana, así como por la disponibilidad de antibióticos para curarla hizo pensar que el problema desaparecería en breve plazo. La frustración de esas expectativas renovó el interés por la enfermedad que, ya en este siglo, se ha mostrado más compleja y resistente de lo que parecía cuando el descubrimiento de su etiología sentó las bases de la moderna medicina infecciosa. El libro que se presenta en esta edición resume muy bien esa complejidad y constituye la fijación del conocimiento actual sobre tuberculosis en España que, sin duda, tendrá su proyección en el resto del mundo. Obra colectiva de 46 autores, cubre todos los campos del conocimiento relacionados con la tuberculosis, con la perspectiva epidemiológica global de la profesión veterinaria y, analiza el impacto de la infección en todas las especies incluida la *Homo sapiens*. La tuberculosis es, sin duda, una de las enfermedades más importantes que afectan al continuo animal, puesto que responde a la respuesta del organismo hospedador frente a un género de bacterias de características muy singulares que, en formas ligeramente distintas, cubre todo el espectro de especies de vertebrados. Los remotos orígenes del grupo y su relación con dichas especies, en la era de los microbiomas y de la inmunidad aprendida, de hecho, nos obliga a pensar que quizás las micobacterias tengan un papel importante en el equilibrio ecológico como complemento externo de la maduración del sistema inmune, cuyo coste es la eliminación por enfermedad de la fracción de portadores cuyas defensas no son capaces de reaccionar adecuadamente. Este coste es el que la tecnología sanitaria y la organización administrativa tratan de eliminar. El esfuerzo que, desde hace más de un siglo, vienen haciendo las sociedades más desarrolladas para controlar y erradicar la infección ha dado sus frutos, sin duda, pero requiere un cambio de perspectiva al que esta obra podrá servir de cimiento. El trabajo que aquí se presenta constituye una obra coral entrecruzada que es modelo de la colaboración y transferencia científica española ya que incluye todo el espectro de actores técnicos: desde los generadores y transmisores de ciencia en la Universidad y Centros INIA-CCAA a los usuarios en la Administración central y periférica.

La lucha contra la tuberculosis bovina es un proyecto en el que los que la iniciaron no vieron alcanzados sus objetivos y al que más de uno hemos dedicado toda una vida profesional. La transmisión del conocimiento actual e histórico que este libro aporta, garantiza que el éxito, que ya está al alcance de la mano, se aproxime más rápidamente y que las vicisitudes del camino queden fehacientemente documentadas. Por ello, gracias y felicitaciones a los editores y a los autores.

Dr. Ramón A. Juste Jordán

Índice de capítulos

1.	Introducción: la tuberculosis y sus antecedentes históricos, dónde estamos y cómo hemos llegado a la situación actual	15
	<i>José Luis Sáez, Ramón Juste, Marta Muñoz, Olga Mínguez, Lucas Domínguez</i>	
2.	Situación de la tuberculosis animal: mundo, Europa, Península Ibérica. Legislación que aplica	29
	<i>Olga Mínguez, José Luis Sáez, Julio Álvarez, Marta Muñoz</i>	
3.	Tuberculosis como zoonosis	41
	<i>José Manuel Benítez-Medina, Remigio Martínez, Lucas Domínguez</i>	
4.	Avances en investigación	53
4.1.	Epidemiología	55
4.1.1.	Caracterización molecular y secuenciación masiva	55
	<i>Víctor Lorente, Pilar Pozo, Julio Álvarez, Beatriz Romero, Lucía de Juan</i>	
4.1.2.	Modelos de transmisión	67
	<i>Pilar Pozo, Julio Álvarez, Alberto Allepuz, Giovanna Ciaravino</i>	
4.1.3.	Encuestas epidemiológicas	78
	<i>Giovanna Ciaravino, Marta Muñoz, Alberto Allepuz</i>	
4.2.	Diagnóstico	93
4.2.1.	Pruebas de intradermorreacción (IDTB)	93
	<i>Lucía de Juan, Álvaro Roy, Alberto Díez, Lucas Domínguez, Javier Bezos</i>	

4.2.2.	Ensayos de liberación de interferón gamma para el diagnóstico de tuberculosis (IGRAs)	106
	<i>Bernat Pérez de Val, Julio Álvarez, José Domínguez, Mariano Domingo, Javier Bezos</i>	
4.2.3.	Interferencias en el diagnóstico ante mortem	120
	<i>Álvaro Roy, Julio Álvarez, Catalina Picasso-Risso, Antonio Rodríguez-Bertos, Javier Bezos</i>	
4.2.4.	Serología en especies domésticas y silvestres	131
	<i>José Antonio Infantes-Lorenzo, Inmaculada Moreno, Jobin Thomas, M^a Ángeles Risalde</i>	
4.2.5.	Diagnóstico anatomopatológico y vigilancia en mataderos	141
	<i>Enric Vidal, Ana Balseiro, Alberto Marco, Mariano Domingo</i>	
4.2.6.	Detección del complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (MTBC) mediante técnicas moleculares sobre muestras clínicas y ambientales	149
	<i>Iker A. Sevilla, Víctor Lorente, Lucía de Juan, Lucas Domínguez, Beatriz Romero</i>	
4.2.7.	Técnicas bacteriológicas	162
	<i>Víctor Lorente, Lucía de Juan, Javier Bezos, Lucas Domínguez, Beatriz Romero</i>	
4.3.	Los hospedadores	170
4.3.1.	El reservorio bovino	170
	<i>Joseba Garrido, M^a Ángeles Risalde, Jordi Casal, Iker A. Sevilla</i>	
4.3.2.	El caprino	178
	<i>Alicia Aranaz, Bernat Pérez de Val, Javier Bezos</i>	
4.3.3.	El ovino	186
	<i>Marta Muñoz, Olga Mínguez, Ana Balseiro</i>	
4.3.4.	El porcino	194
	<i>Ignacio García Bocanegra, Javier Hermoso de Mendoza, David Cano</i>	
4.3.5.	Los cérvidos	208
	<i>José Ángel Barasona, Antonio Carpio, Ignacio Vargas, José Manuel Benítez-Medina, David González</i>	
4.3.6.	El jabalí	219
	<i>Remigio Martínez, Christian Gortázar</i>	
4.3.7.	El tejón	224
	<i>Ana Balseiro, Francisco Javier Salguero, Marta Barral, Miguel Prieto</i>	

4.4.	Investigación para el control de la tuberculosis	
4.4.1.	Los programas de bioseguridad en explotaciones ganaderas para evitar el contacto con reservorios silvestres	231
	<i>Joaquín Vicente, Ana Balseiro, Alberto Allepuz, Saúl Jiménez-Ruiz</i>	
4.4.2.	Control sanitario en especies cinegéticas	246
	<i>Christian Gortázar, Ana Balseiro</i>	
4.4.3.	Co-infecciones y otras fuentes de inmunosupresión	255
	<i>Javier Hermoso de Mendoza</i>	
4.4.4.	Vacunación en animales domésticos	267
	<i>Ramón Juste, Joseba Garrido, Bernat Pérez de Val, Iker A. Sevilla</i>	
4.4.5.	Vacunación en fauna silvestre	275
	<i>M^a Ángeles Risalde, Ramón Juste, Joseba Garrido, Iker A. Sevilla, Christian Gortázar</i>	
5.	Reflexiones finales	285
	<i>José Luis Sáez, Marta Muñoz, Christian Gortázar, Ana Balseiro</i>	
	Agradecimientos	293
	Referencias bibliográficas	297

1

Introducción: la tuberculosis y sus antecedentes históricos, dónde estamos y cómo hemos llegado a la situación actual

José Luis Sáez, Ramón Juste, Marta Muñoz,
Olga Mínguez, Lucas Domínguez



La tuberculosis en la antigüedad

La tuberculosis (TB) ha acompañado al ser humano y a los bovinos a lo largo de toda su evolución. La detección de ADN de micobacterias o de lesiones óseas compatibles con TB en restos fósiles (en bisontes en Wyoming de hace 17.000 años y en humanos en Oriente medio de hace 9.000 años), donde se ha identificado *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Rothschild et al., 2001; Hershkovitz et al., 2008), confirma que la enfermedad conocida antiguamente como tisis es muy anterior a la antigua civilización egipcia, donde se documenta por primera vez en el Papiro de Ebers y se demuestra la presencia del ancestro del complejo en momias datadas en el periodo de 1.500-500 años a. C. (Donoghue et al., 2004). En realidad, aunque la secuencia fósil sitúa primero la infección en bovinos, molecularmente se ha determinado que la bacteria bovina procede de un antecesor humano de hace 60.000 años (Galagan, 2014). Diversos estudios sugieren que la TB bovina del antiguo Egipto ya estuvo muy ligada a la actividad ganadera, cuando se comenzaron a domesticar animales con fines productivos en el año 3.300 a. C., aproximadamente (Bedeir, 2004).

La TB fue conocida originalmente como tisis. El mencionado Papiro de Ebers (1.550 a. C.) describe una consunción pulmonar asociada a adenopatías cervicales, que muy bien podría ser la primera descripción del cuadro clínico de la TB pulmonar (Bedeir, 2004). Hipócrates (460-377 a. C.) definió la TB como “la enfermedad más grave de todas, la de curación más difícil y la más fatal” (Ramírez, 2019). En sus aforismos hace una acabada descripción de los síntomas y describe los estertores y los frotos pleurales (que se parecen al roce de una correa de cuero). A este respecto, decía que «un tísico viene de otro tísico y prende más fácilmente en ciertos temperamentos, como pituitosos, flemáticos e imberbes rubios de ojos brillantes,

carnes blandas y omóplatos sobresalientes». Efectuó una descripción detallada de un trastorno pulmonar llamado tisis, que en términos literales significa «fundirse o derretirse» o «desperdiciarse». Para el tratamiento sugirió el uso de sustancias purgantes, la inhalación de ciertos medicamentos, dietas especiales (pan y vino mezclado con agua) y ejercicio físico. En la antigua Grecia no se realizaban autopsias, por lo que Hipócrates observó por primera vez las lesiones granulomatosas características (“tubérculos”) en animales enfermos como vacas, cerdos y ovejas.

Aristóteles (384-322 a. C.), al observar que las personas que tenían contactos estrechos con los pacientes con tisis tendían a desarrollar la enfermedad, sugirió que era causada por alguna sustancia productora de la misma, exhalada hacia el aire en el aliento del paciente. Describió también la denominada “escrófula”, en cerdos enfermos. Esta forma extra-pulmonar de la TB se caracterizaba por un incremento del tamaño de los nódulos linfáticos, principalmente los cervicales, con presencia ocasional de material purulento y que, en ocasiones, ulceraban.

Durante la Edad Media europea apenas hay referencias (y ninguna descripción detallada) de la TB pulmonar, a pesar de ser un proceso bastante frecuente. En esta época, la enfermedad más estigmatizante fue la lepra y la más temida la peste bubónica. Sí existen, sin embargo, abundantes referencias a la forma ganglionar cervical (escrófula, *Maladie du Roy*, *King’s Evil*).

A partir de los siglos VII y VIII, con la extensión del cristianismo, se incorporaron a las ceremonias de coronación los ritos de unción real, que otorgaban un carácter sagrado a la monarquía. A estos reyes ungidos se les atribuían propiedades curativas. La más popular fue el denominado “toque del Rey” por la cual Felipe el Hermoso, Roberto II el Piadoso, San Luis de Francia o Enrique IV de Francia, entre otros reyes, tocaban a los enfermos pronunciando las palabras rituales “El rey te toca, Dios te cura” (*Le Roy te touche, et Dieu te guérit*). El primer rey francés del que se sabe, por documentos escritos, que llevó a cabo este tipo de ritos fue Felipe I, que reinó entre los siglos XI y XII. Los reyes franceses desde entonces solían peregrinar a Soissons para celebrar la ceremonia y se cuenta que Felipe de Valois (1328-1350) llegó a tocar hasta 1.500 personas en un día (Wikipedia, 2019).

Explosión de tuberculosis con la industrialización en Europa

Las crisis ecológicas y económicas del siglo XVII y el inicio de la globalización por las mejoras en la navegación, los desórdenes sociales y políticos, las revoluciones (inglesa) y las guerras en Europa provocaron hambrunas y supusieron el paso desde el feudalismo medieval hacia el capitalismo y la burguesía, preparando el camino hacia la Revolución industrial en el siglo XVIII, con el consiguiente incremento de la población urbana a costa de la rural, con durísimas condiciones de vida para el proletariado urbano.

Efectivamente, el hacinamiento en las ciudades, con interminables jornadas de trabajo, incluso infantil, y el escaso acceso a la medicina de las clases menos pudientes se unió con una verdadera epidemia de alcoholismo a causa de la ginebra en Inglaterra, la absenta en Francia y el aguardiente en España. A partir de 1690, se introducía la ginebra en Inglaterra, fomentada por la monarquía para aumentar el precio del grano y se alcanzó el máximo consumo en 1751, con unas 7.000 *gin houses* en Londres para una población de unos 600.000 habitantes. Se ha calculado que en todo momento había un 25% de borrachos en Londres que constituían un excelente caldo de cultivo para una infección crónica oportunista como la TB. La consecuencia fue que la tisis llegó a suponer el 20% de todas las muertes en la Inglaterra de los siglos XVI a XVIII. Este periodo de expansionismo de los imperios británico y español proporcionó las condiciones ideales para la globalización de la TB (Figura 1).



Figura 1. William Hogarth (1751). Gin Lane. Grabado.

Principales hitos históricos en el conocimiento sobre tuberculosis

En la Italia renacentista, el médico, poeta y matemático Girolamo Fracastoro (1478-1553) empleó el término "tisis" para referirse únicamente a la consunción pulmonar y fue el primero en postular en su estudio *De contagione* que la tisis se transmitía por un "virus" que era capaz de sobrevivir hasta dos años en la ropa de los enfermos. A partir del siglo XIV, con los estudios de anatomía humana y el desarrollo de técnicas de examen *post mortem*, se pudo comenzar a correlacionar los hallazgos de las autopsias con los síntomas de la enfermedad.

En 1720, el médico inglés Benjamin Marten (1704-1782) publicó el libro *New theory of consumptions, more especially of a phthisis or consumption of the lungs*, en el cual difundió la teoría que se confirmaría 150 años después y que sugería que la enfermedad era causada por “pequeñas criaturas vivas” que una vez que colonizaban el cuerpo daban lugar a lesiones y síntomas característicos de la tisis.

En 1761, Leopold von Auenbrugger, con su *Inventum Novus ex percussione thoracis ut signu abstrusos interni pectoris morbus detergendi*, había observado a su padre como percutía los toneles de vino para reconocer si los cascós estaban llenos o vacíos, y experimentó aplicando esa técnica en pacientes y cadáveres.

A partir del siglo XIX es cuando se puede hablar de investigación en TB propiamente dicha. La conjunción de los hallazgos hechos hasta la fecha por los diferentes investigadores y el desarrollo del estetoscopio y la auscultación por Laënnec (1781-1826) permitieron grandes avances, acuñándose el término TB en el año 1834 por Lukas Schönlein (1793-1864), para referirse al padecimiento de las lesiones denominadas tubérculos.

Las primeras descripciones detalladas de la enfermedad en bovinos por Ernst Gurlt, a principios del siglo XIX en Francia, señalan similitudes entre la enfermedad humana y bovina. Se identifica como entidad veterinaria (tos, disnea y consunción), se detalla su diagnóstico clínico (auscultación, estertores crepitantes y sibilantes) y lesiones (consunción asociada con nódulos pulmonares u otras localizaciones), se señala su etiología (desgaste por demanda productiva y deficiente alimentación, mala higiene de los establos y conformación torácica) y se propone su tratamiento (higiene, dieta, manejo en pastoreo, sangrías y sacrificio).

Finalmente, Jean Antoine Villemin (1827-1892) publicó en 1865 un estudio pionero titulado *Cause et nature de la tuberculose: son inoculation de l'homme au lapin* (Barberis et al., 2017) en el que demostró que la tisis humana y la del ganado bovino podían ser transmitidas a los conejos y las cobayas y que, por tanto, constituían una entidad similar, es decir, lo que conocemos actualmente como una zoonosis. Villemin observó que la inoculación de sangre o esputo de conejos con TB en otros animales de laboratorio reproducía la enfermedad, fenómeno que no ocurría al hacerlo con tejido tumoral. A la luz de este gran descubrimiento, Villemin fue el primero en postular que la enfermedad estaba producida por un microorganismo específico presente en el aire.

En España, en 1830, Casas y Sampedro relacionaron la enfermedad con cuerdas insalubres y describieron su diagnóstico sintomatológico (Gutiérrez, 2003). A partir de 1895, fueron numerosos los escritos veterinarios sobre la necesidad de utilizar la tuberculina, que no estuvo disponible en España hasta prácticamente los años 1950.

Aislamiento del agente causal y avances del siglo XX

El mayor hito en microbiología médica fue, sin duda, el aislamiento del agente causal de la TB por Robert Koch (1843-1910) (Figura 2). El 24 de marzo de 1882 (desde entonces día mundial de la TB), Koch hizo público en una ponencia ante la Sociedad Fisiológica de Berlín pruebas irrefutables de que la TB era causada por una bacteria específica, a la que denominó "bacilo tuberculoso". Inicialmente, Koch fue incapaz de cultivar la bacteria, aunque posteriormente desarrolló un medio empleando sangre coagulada de buey y oveja, que le permitió obtener crecimiento de la bacteria en pureza, para reproducir la infección en animales. Con ello se probaba definitivamente el carácter infeccioso de la TB proporcionando un mecanismo claro de causalidad, que el propio Koch resumió en sus famosos postulados que han sido la clave en el desarrollo de toda la medicina infecciosa humana y veterinaria posterior y, el fundamento de la mayor revolución médica de la historia, al sentar las bases teóricas que, posteriormente, permitieron proveer a la humanidad de métodos de lucha tan eficaces como las vacunas y los antibióticos.



Figura 2. Foto de Robert Koch.

En este sentido, los primeros intentos de controlar la infección consistieron en el desarrollo de un producto que el gobierno prusiano le empujó a fabricar como tratamiento de la TB a partir de bacilos tuberculosos muertos, que denominó linfa y más tarde tuberculina (actualmente conocida como tuberculina vieja de Koch), pero que provocó graves reacciones en algunos pacientes. La sustitución de la tuberculina de Koch, elaborada a partir de *M. tuberculosis*, por otro tipo de tuberculina desarrollada por Seibert y Munday en 1932, dió lugar a la tuberculina en forma de derivado proteico purificado (PPD), ya con fines puramente diagnósticos (Buza et al., 2004).

En los inicios del siglo XX, se continuó con las estrategias de curación basadas en los sanatorios para tuberculosos, pero se dió un paso más allá con la investigación de tratamientos quirúrgicos y, posteriormente, con la aparición de las medicinas antituberculosas, cuyo desarrollo logró convertir a la TB en una enfermedad curable. A mediados del siglo XX, se desarrolló al fin la que sería a la postre otra herramienta de gran importancia en la lucha frente a la TB: la vacuna basada en el bacilo de Calmette y Guérin (*M. bovis* BCG).

Desde principios del siglo pasado, se conoce el carácter zoonótico de la TB y cómo la infección en los animales supone una amenaza para la salud humana, a pesar de que Koch llegó a afirmar en una conferencia sobre TB en Londres, en 1901, que

el agente causal de la TB animal no representaba una amenaza para el ser humano y, por tanto, no había necesidad tampoco de intentar controlar la enfermedad en el ganado. Quizás por ese motivo, hasta mediados de siglo no se constituyeron en Europa planes obligatorios de control de esta enfermedad en el ganado. Algunos planes de control voluntario se introdujeron por primera vez en 1935, momento en el cual el 40% del ganado bovino en Gran Bretaña presentaba lesiones compatibles con TB. Estos planes de control, basados en el análisis de todos los animales mediante la prueba de la tuberculina y el sacrificio de los reactores, con una compensación económica al ganadero, se transformaron en obligatorios en 1950.

Muy distinta fue la situación en Estados Unidos, donde los informes de la *Royal Commission On Tuberculosis*, informaron en 1895 de la contagiosidad del bacilo bovino, y posteriormente en 1898 del peligro para la salud humana de los productos derivados de los animales enfermos de TB. Esta situación llevó a considerar las lecherías, carnicerías y establos como zonas de riesgo potencial para la salud pública, prohibiéndose la venta de leche y carne proveniente de vacas infectadas. En 1902 se consiguió demostrar taxativamente la evidencia, cuando Ravenel consiguió aislar *M. bovis* a partir de niños con meningitis tuberculosa. El citado aislamiento, el excelente trabajo de Griffith para la británica *Royal Commission On Tuberculosis*, en 1907, y el aislamiento de *M. tuberculosis* (bacteria con muy baja virulencia para los bovinos) en productos animales, supusieron un cambio en el panorama técnico y científico, ya que taxativamente se afirmaba la patogenicidad del agente de la TB bovina para personas y distintas especies de animales (incluyendo primates), así como el riesgo del consumo de productos derivados de animales enfermos (detectando la presencia de la bacteria en la leche de vacas que no presentaban lesiones en la ubre). Estos avances sentaron las bases, en muchos países, para el inicio de una verdadera salud pública veterinaria (*Higia pecoris salus populi*) y constituyeron el inicio de los programas de control de las enfermedades transmisibles de los animales al ser humano, a través del control de los productos de origen animal, mediante la inspección en el matadero y el tratamiento térmico en las centrales lecheras (Domínguez y Bezos, 2014).

Se adoptaron drásticas medidas como la inspección de la carne, la prohibición de venta de productos de animales tuberculosos y, sobre todo, la pasteurización de la leche. Esta última fue puesta en marcha masivamente entre los últimos años del siglo XIX y primeros del siglo XX, por parte de los países más avanzados de la época (Reino Unido, países nórdicos y Estados Unidos), lo que implicó una dramática reducción de los casos de TB de origen zoonótico, fundamentalmente de las formas extra-pulmonares. Tanto es así que la pasteurización está considerada como uno de los éxitos de la salud pública más importantes de la historia y uno de los avales para continuar y profundizar en la inspección y control de los alimentos, que ha hecho posible reducir significativamente la diseminación de las enfermedades infecciosas de los animales a las personas.

Los programas de erradicación de la tuberculosis en el ganado bovino

A partir del momento en el que se demuestra el carácter zoonótico de la TB y que la mayor fuente de ésta para el ser humano eran los bovinos infectados, los países que estaban liderando el movimiento para el control de la TB decidieron ir más allá e implementar las medidas con una actuación hasta ese momento nunca practicada: la erradicación de la enfermedad en el ganado bovino. Los países que podemos considerar pioneros en aplicar alguna forma de control frente a la enfermedad fueron Finlandia y Dinamarca. En 1890, Bernhard Bang aplicó en Dinamarca la tuberculina desarrollada por Koch y comprobó las posibilidades que este reactivo tenía para el diagnóstico de la TB en animales asintomáticos, desarrollando una estrategia que todavía lleva su nombre (método de Bang). Inmediatamente, se aplicó por Gutmann en Rusia y Pearson en Estados Unidos. Este sistema consistía en el diagnóstico mediante pruebas de tuberculinización de los animales infectados y su sacrificio inmediato, como forma de rotura del ciclo de contagio.

Sin embargo, otros países como Alemania se decantaron por un sistema distinto propugnado por Ostertag en 1917, basado en el examen clínico de los animales y el sacrificio de los animales con sintomatología o excretorios. Con este sistema sólo se podían diagnosticar aquellos animales en fases avanzadas de la enfermedad, lo que constituía menos de un 10% del total de los animales infectados, y lo que era más importante, este sistema era incapaz de diagnosticar el 90% de los animales infectados, que eran asintomáticos pero que podían transmitir la enfermedad. Por ello, este método fue abandonado en los años 40 (Cuezva-Samaniego, 1966).

En 1917, casi 30 años después de que Bang propusiera su sistema de erradicación, Estados Unidos implantó un controvertido programa de erradicación basado en el diagnóstico de la TB mediante la prueba intradérmica de la tuberculina y el sacrificio obligatorio de los reaccionantes positivos (método americano o de Bang modificado), sin una compensación total de las pérdidas a los ganaderos (Olmstead y Rhode, 2004). Entre 1917 y 1940, se aplicaron 400 millones de dosis de tuberculina y se sacrificaron casi 4 millones de animales de una cabaña de 66 millones. El programa tuvo un enorme éxito: en 1941 la prevalencia había descendido desde el 5% a menos del 0,5%. Este programa fue básicamente el que, de manera progresiva, se iría implantando en Europa con 20-30 años de diferencia, aplicándose en España de manera más genérica a partir de 1965.

El control de la tuberculosis en España

En nuestro país, el Reglamento de Epizootias de 1933, en sus artículos 153 y 158, autorizaba como método de lucha la vacunación con BCG: “se empleará en terneros y especialmente en las terneras de establos infectados, en los primeros 8

días tras el nacimiento y repitiendo la vacunación cada año". Este requerimiento normativo no se llevó a la práctica. Por otra parte, hasta 1950, fue prácticamente imposible que los veterinarios españoles pudieran disponer de tuberculina, puesto que la importación no estaba autorizada, y no existía producción propia. Durante este tiempo, hubo proliferación de planes regionales, bastante descoordinación, y aplicación de distintos métodos (Ostertag, Bang), lo que supuso que muy pocos animales se sometiesen a pruebas de tuberculina.

Las primeras actuaciones oficiales de lucha frente a la TB bovina se iniciaron en España a principios de los años 50, con base legal en la Ley de Epizootias de 1952 y su Reglamento de 1955. El 19 de junio de 1950 se inauguró, de manera simbólica, la primera campaña oficial de saneamiento ganadero, en la localidad de Suesa, en el Ayuntamiento de Ribamontán del Mar (Santander). Se realizó la prueba de la tuberculina según el método de Bang (Cuezva-Samaniego, 1966, Figura 3). Posteriormente, se extendió la campaña al País Vasco, Asturias y León, donde se concentraba el ganado de aptitud lechera.



Figura 3. Libro e imagen de Jesús Cuezva-Samaniego.

En 1965, se estableció, mediante la Orden de 24 de mayo, un Plan nacional de lucha contra la TB y la brucelosis en ganado bovino, centrado principalmente en los principales núcleos de vacuno lechero del norte y centro de España. Estos primeros pasos de los programas se centraron en chequeos diagnósticos con fines estadísticos, indicando una incidencia en animales aproximada del 20%. Posteriormente, el Ministerio de Agricultura promulgó, en 1978, la Orden de 25 de noviembre, en la que se fijaban las normas básicas para las Campañas de Saneamiento Ganadero (CSG) en el territorio nacional.

Tras la entrada de nuestro país en la Comunidad Económica Europea (CEE), España presentó en 1987 un Programa de erradicación acelerada, de acuerdo con las Directivas 77/391/CEE y 78/52/CEE y la Decisión 87/58/CEE. Este programa se aprobó el 15 de mayo de 1987, mediante la Decisión 87/292/CEE. La normativa

europea se traspuso a la nacional mediante la Orden de febrero de 1986 y el Real Decreto 379/1987. Los Programas nacionales de erradicación de la TB bovina han sufrido diversas modificaciones y orientaciones desde entonces, con el fin de adaptarse a los cambios acontecidos en el manejo de los animales y en la estructura de las explotaciones, a los flujos comerciales y al conocimiento científico de la enfermedad (diagnóstico, epidemiología, patogenia, inmunología, etc.).

En febrero de 1990, se produjo un acuerdo Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación (MAPA)-Comunidades Autónomas para elaborar un Programa acelerado de erradicación de cara al Mercado Único de 1993. Se publicaron la Orden Ministerial de 1 de febrero de 1990, por la que se modificaba el anexo C de la Orden de 28 de febrero de 1986, y la Orden Ministerial de 9 de febrero de 1990, por la que se establecían medidas complementarias en las CSG. En esta última se establecía la identificación individual de los animales objeto de CSG mediante un crotal metálico, el sacrificio de los reaccionantes positivos en mataderos autorizados y el traslado de los mismos mediante un documento especial o "conduce". A partir de enero de 1991, se autorizaba el transporte de los animales de aptitud láctea que concurrían a ferias y mercados, si habían sido sometidos a CSG con resultados negativos y, a partir de enero de 1992, el de animales de aptitud cárnica (Figura 4). En estos años iniciales de la década de los 90, se continuaba actuando preferentemente sobre el bovino de leche, pero se incrementó considerablemente el censo de carne sometido a pruebas en las Comunidades Autónomas que no actuaban sobre prácticamente el 100% del censo en años anteriores, sobre todo en regiones o comarcas donde convivían ambas aptitudes productivas (Domínguez y Bezos, 2014).



Figura 4. Mercado de ganados de Ávila, años 80.

La entrada en vigor del Mercado Único en 1993 y de toda la normativa comunitaria relacionada supuso un impulso en la ejecución del Programa nacional. Se consiguió actuar sobre un 90% del censo, chequeándose en torno a 3,5 millones de animales. Por tanto, podemos considerar ese año como punto de partida de la implementación del Programa nacional de forma homogénea en toda España. No obstante, quedaba una parte relevante del censo bovino, el ganado de lidia, que no se incluyó en el Programa hasta el año 2004, a través del Real Decreto 1939/2004.

Los Programas nacionales de erradicación de la TB bovina 2006-2010 supusieron un cambio cualitativo en el planteamiento de los objetivos, y sentaron las bases para garantizar actuaciones continuadas en el tiempo bajo un enfoque plurianual, establecido en 5 años. Uno de los objetivos principales de estos programas fue incrementar la sensibilidad (Se) del diagnóstico, tanto a nivel de rebaño como individual. El incremento en la frecuencia de las pruebas anuales, tanto en rebaños no calificados como en rebaños calificados de zonas de alta prevalencia, la realización de pruebas previas a los movimientos de animales, la inclusión de protocolos normalizados de trabajo para la realización de las pruebas diagnósticas, la intensificación de las inspecciones sin previo aviso sobre los equipos de campo, la aplicación de criterios severos en la interpretación de la intradermotuberculinización (IDTB) simple o el incremento paulatino de las pruebas complementarias de interferón-gamma (IFN- γ) en rebaños positivos confirmados, constituyeron las medidas principales para incrementar la Se. Otras medidas adicionales introducidas paulatinamente para gestionar los factores identificados han sido medidas de gestión de posibles reservorios silvestres o la integración del sistema de vigilancia en mataderos.

En el año 2010, coincidiendo con el 60 aniversario de la primera actuación oficial de campaña frente a la enfermedad, se celebraron en Santander las Jornadas de Debate para la Erradicación de la Tuberculosis Bovina, a las que asistieron 80 participantes de España y Portugal, en representación de las administraciones públicas, sectores interesados en el programa y centros de investigación. De estas jornadas surgieron una veintena de conclusiones que definieron las líneas maestras que inspiraron los programas nacionales posteriores a 2012. Ya en dichas jornadas se señalaron cuestiones fundamentales, nunca antes abordadas, como la necesidad de formación y validación de los profesionales implicados en la ejecución de las pruebas de campo, la especialización de los profesionales encargados de realizar las encuestas epidemiológicas, la utilidad de ampliar el uso de la prueba del IFN- γ como prueba complementaria (aprovechando el esfuerzo realizado para la dotación técnica de prácticamente todos los laboratorios provinciales bajo la coordinación del Laboratorio Nacional de Referencia de Santa Fe), la importancia de incorporar de forma efectiva en el programa el componente de vigilancia en matadero, la importancia de contar con la colaboración del sector para que perciba el problema como propio y la búsqueda de medidas y

herramientas administrativas que permitan asegurar la viabilidad económica de las explotaciones. También se toma conciencia de que aunque el ganado bovino continúa siendo el principal reservorio de la enfermedad, los reservorios domésticos y silvestres constituyen un factor clave fuera del radio de acción de las CSG, y requieren un abordaje común por parte de ganaderos, cazadores, veterinarios y administraciones públicas de sanidad animal y medio ambiente. Especial importancia adquiere la minimización del acceso de los jabalíes a los residuos de caza, limitando la alimentación suplementaria y la sobreabundancia de estos animales y desarrollando un Programa nacional de vigilancia en fauna silvestre.

Para incorporar todas estas cuestiones en la elaboración de los programas de erradicación anuales, a partir de 2012, se constituyó un grupo de trabajo específico formado por expertos del Ministerio, Comunidades Autónomas y Laboratorio Nacional de Referencia, con objeto de planificar la siguiente campaña en función de la evolución epidemiológica existente en años anteriores, la información científica más actualizada disponible y las recomendaciones de la misiones de la Oficina Alimentaria y Veterinaria (FVO) (DG SANTE, Comisión Europea) y del Subgrupo de la Tuberculosis Bovina de la Task Force, así como el documento de trabajo "Erradicación de la tuberculosis bovina en la Unión Europea (UE)" (SANCO/10067/2013) elaborado por dicho Subgrupo. Entre los objetivos de ese documento estaban: proveer de unas pautas para el diseño de programas de vigilancia y erradicación de TB bovina, mejorar la eficiencia de los ya establecidos y adaptarlos a las situaciones epidemiológicas existentes. Además, en ese documento se propuso como definición de TB bovina a aquella infección en el ganado bovino producida por cualquiera de las micobacterias incluidas en el complejo MTBC y no a la exclusivamente ocasionada por *M. bovis*. Este citado grupo de trabajo continúa con esta sistemática de actuación y es preciso hacer una mención y agradecimiento especial a miembros destacados del mismo que nos dejaron durante este periodo, curiosamente compañeros ambos de Universidad en la Facultad de Veterinaria de Córdoba: Mari Carmen Pieltain y Alberto Pacios, que en paz descansen.

El programa español se centra, desde entonces, en ir incorporando las distintas medidas, entre las que se citan: combatir las principales causas más probables de infección, identificadas en el estudio de investigación epidemiológica de focos de TB en España (Guta et al., 2014a), incrementar la Se diagnóstica en el diagnóstico de campo y laboratorial, formar a los equipos de saneamiento para combatir la infección residual, fomentar la colaboración con los servicios veterinarios de salud pública en la vigilancia en mataderos y establecer las medidas de control sobre los reservorios silvestres como líneas maestras. La importancia de la correcta realización de la prueba de la tuberculina es tal que distintos países, entre ellos España, han incluido en sus programas de erradicación la necesidad de superar cursos de formación y pruebas de validación para todos los veterinarios

implicados en las campañas de saneamiento, así como un posterior sistema de control oficial para continuar asegurando dicha validación. En relación a la fauna silvestre, en 2017, se publicó el Plan de actuación de tuberculosis en especies silvestres, desde entonces conocido como PATUBES, plan pionero a nivel de la UE, que fue elaborado por expertos en TB y fauna silvestre tanto de las administraciones públicas como de los principales centros de investigación, y aprobado por todas las autoridades competentes en la materia que, actualmente, está en pleno proceso de desarrollo legislativo. La iniciativa de elaborar este libro blanco con la estrategia de actuación en fauna silvestre surgió en el I Workshop Nacional sobre TB animal celebrado en Gijón en septiembre de 2015.

Paralelamente a la inclusión de todas estas medidas de refuerzo se han ido incluyendo igualmente ciertas medidas de flexibilización permitidas por la normativa o por los documentos de trabajo de la Comisión Europea allí donde ha sido posible, como el proyecto piloto para la autorización de movimientos de terneros desde explotaciones positivas a cebaderos, el protocolo de flexibilización para zonas de baja prevalencia y otras medidas más técnicas, como excepciones a las pruebas pre-movimiento, la posibilidad de usar la prueba de diagnóstico IDTB comparada o la posibilidad de ampliar a 2 años el intervalo entre las pruebas rutinarias, en función de la prevalencia.

Y aquí acabamos con nuestro recorrido, en el año 2019, en el cual se ha celebrado en el mes de abril en Cáceres el I Workshop Ibérico y II Nacional sobre investigación en TB animal (Figura 5), durante el cual se han revisado buena parte de las medidas hasta ahora implementadas pero sobre todo las que aún requieren de investigación para ser aplicadas en los próximos años de cara a cumplir el objetivo final marcado por el Programa nacional de erradicación de la TB bovina, que es alcanzar niveles de erradicación (menos del 0,1% de rebaños infectados) en el año 2030. Por el momento, la Comisión Europea ya ha comenzado otorgando el estatuto de libre a Canarias y a la provincia de Pontevedra. Esperamos que el resto de territorios del país se vaya sumando en los próximos años.



Figura 5. Logo del I Workshop Ibérico y II Nacional sobre investigación en tuberculosis animal.

2

Situación de la tuberculosis animal: mundo, Europa, Península Ibérica. Legislación que aplica

Olga Mínguez, José Luis Sáez, Julio Álvarez, Marta Muñoz



La tuberculosis animal en el mundo

La TB animal es un problema global que no se puede circunscribir a un entorno geográfico limitado, ya que se trata de una enfermedad que está presente en el mundo entero. La prevalencia más elevada se registra en buena parte del territorio de África y ciertas áreas de Asia y América (Figura 6), es decir, en aquellos países donde los programas de control y las medidas preventivas no están lo suficientemente implementadas; si bien, la información sobre la distribución de la enfermedad en esas regiones es muy limitada debido precisamente a la ausencia de programas de vigilancia y control.

Entre 2015 y 2016, 179 países y territorios reportaron su estatus con respecto a la TB bovina a la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2019), y cerca de la mitad de estos países informaron de la presencia de la enfermedad en sus poblaciones animales (Figura 6).

Aunque en la mayoría de los países económicamente más desarrollados la enfermedad está bajo control, describiéndose valores de prevalencia en general bajos, la persistencia de la infección en ciertas especies silvestres (como el tejón en el Reino Unido, el ciervo de cola blanca en ciertas partes de los Estados Unidos o la zarigüeya en Nueva Zelanda) complica el objetivo de lograr su completa eliminación.

Existen algunos países donde la TB no ha supuesto históricamente un gran problema. Así mismo muchos países desarrollados han reducido o eliminado la TB en su población de ganado y/o han mantenido la enfermedad limitada a una o más zonas. En la mayor parte de los países el mecanismo de control y erradicación de la enfermedad se basa en el diagnóstico sistemático de toda o una parte de la cabaña ganadera y el sacrificio de los reaccionantes positivos. Esta pauta ha sido y continúa siendo exitosa en la mayor parte del territorio mundial, si bien sería muy complicado comenzar a aplicarla por primera vez en determinados países con alto nivel de infección por el coste económico y social que implica.

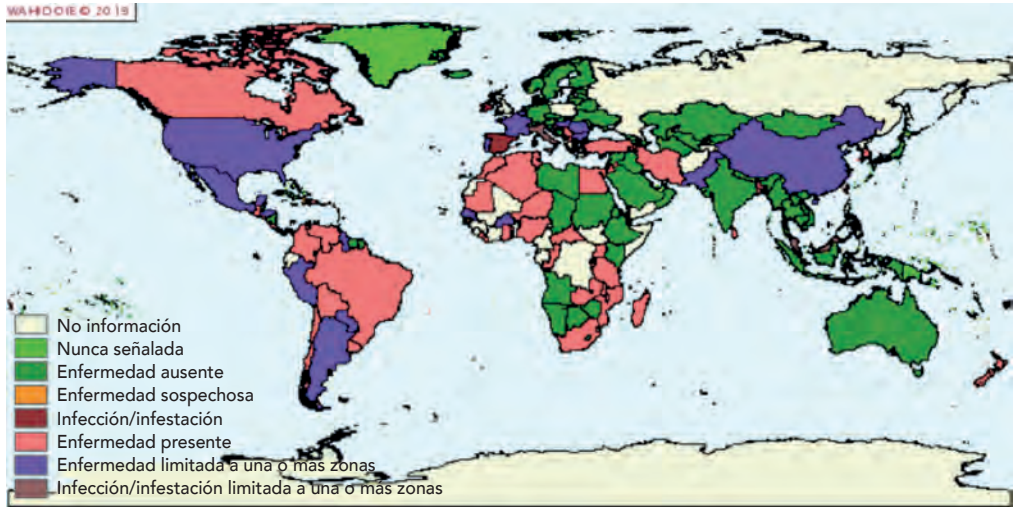


Figura 6. Mapa de distribución mundial de la tuberculosis bovina.
Fuente: OIE (2019). WAHIS interface.

Un ejemplo del éxito de esta estrategia de control basada en el test y sacrificio es la evolución de la prevalencia de enfermedad en los Estados Unidos, país en el que se implantó en los primeros años del siglo XX un programa consistente en la aplicación sistemática de pruebas diagnósticas y sacrificio obligatorio de los animales positivos. El diagnóstico se realizaba mediante la IDTB. Entre 1917 y 1940 se realizaron unos 232 millones de pruebas y se sacrificaron 3,8 millones de bovinos, aproximadamente, lo que supuso un 5,7% del censo nacional (Naugle et al., 2014). De este modo la enfermedad se consideró erradicada (Figura 7) con la única excepción de una parte del estado de Michigan, en el que la infección está presente en poblaciones silvestres.

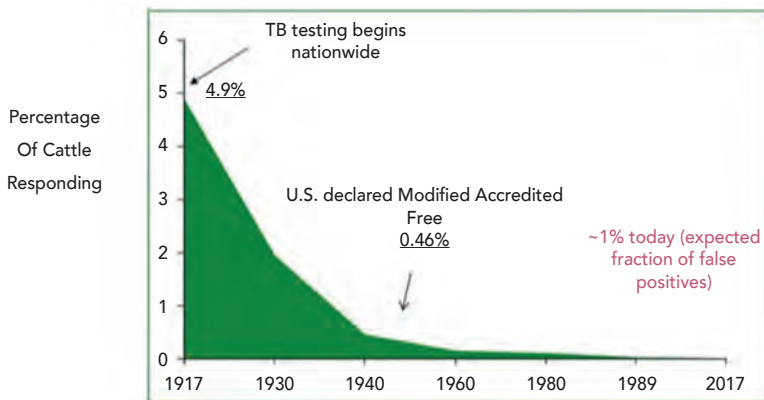


Figura 7. Porcentaje de bovinos con reacciones positivas a intradermoreacción (IDTB) en Estados Unidos, 1917-2017.

Fuente: United States Department of Agriculture. Animal and Plant Health Inspection Service.

En la actualidad, en la mayor parte de los países del continente americano existen programas de control y erradicación, todos ellos basados en el diagnóstico y el sacrificio. Estos programas se aplican en algunos casos de manera sistemática mientras que en otros casos existen programas con un alcance más limitado, adaptados en base al nivel de infección de la zona y/o a las necesidades de calificación de los rebaños.

La situación en el continente africano supone un problema grave para la salud pública, existiendo intentos de control de la enfermedad a partir de las estimaciones de la prevalencia en distintos países. A modo de ejemplo Etiopía está trabajando intensamente en el conocimiento de la enfermedad en la cabaña ganadera; los datos obtenidos en la actualidad revelan que la prevalencia de la infección en bovinos de raza frisona se cifraría en un 21,6% (95% CI: 14,7–30,7), dato superior al obtenido en los cebús autóctonos, en los que se ha estimado en un 4,1% (95% CI: 3,4–4,9) (Sibhat et al., 2017).

En la UE, la situación es heterogénea y no ha mejorado en los últimos años. A finales de 2018, 17 Estados Miembros de la Unión habían alcanzado el estatus de “Oficialmente Libres” de TB bovina, y de los 11 Estados Miembros no oficialmente libres, 4 de ellos (Italia, Portugal, España y el Reino Unido) presentaron algún territorio declarado como oficialmente libre (EU One Health Zoonoses Report, 2018).

En el resto de Europa, Noruega, Suiza y Liechtenstein son oficialmente libres (de acuerdo a la legislación europea), y en el caso de Islandia no se ha reportado ningún caso de TB bovina desde 1959.

En el Reino Unido, en cambio, la situación se puede considerar un gran fracaso. Después de la II Guerra Mundial diversos países del centro y norte de Europa pusieron en marcha la estrategia estadounidense. Desde los años 50 hasta la década de los 80 se consiguieron niveles próximos a la erradicación. En 1958 se sacrificaron más de 25.000 bovinos y en 1986 únicamente 235, pero en 2016 se superaron los 35.000 bovinos sacrificados (DEFRA, 2019). A pesar de ser un tema de gran controversia y debate, parece bastante aceptado que este aumento coincidió con un cambio de política en cuanto al control de la enfermedad (Pérez de Val y Allepuz, 2019).

La Tabla 1 muestra el nivel de prevalencia en los países de la UE con programas de erradicación cofinanciados.

Tabla 1. Situación en los países de la Unión Europea (UE) con programas cofinanciados, 2017.

PAISES UE NO oficialmente libres	Nº rebaños	Rebaños positivos
Irlanda - IE	113.697	4,89%
Italia - IT	51.718	0,80%
Portugal - PT	41.236	0,28%
España - ES	115.889	2,32%
Reino Unido - UKK	22.735	20,38%
Reino Unido - UKL	11.973	12,45%
Reino Unido - UKNO	23.939	12,40%

UKK: Inglaterra; UKL: Gales; UKNO: Irlanda del Norte.

En España, los últimos datos oficiales cifran la prevalencia de rebaños en un 1,90% en 2019. La situación empeoró considerablemente en el año 2015 (pasando de un 1,72% de rebaños positivos en 2014 a un 2,81%), situándose el incremento de casos principalmente en las Comunidades Autónomas de Andalucía, Extremadura y Castilla-La Mancha. Esto supuso modificaciones en la implementación del programa nacional que han logrado revertir la situación.

Legislación aplicable

La legislación aplicable es compleja y abarca diferentes niveles administrativos, desde el más amplio (a nivel internacional), hasta la administración europea, nacional y autonómica.

Normas internacionales

A nivel internacional las normas se recogen en el Capítulo 8.11. "Infección por el complejo *Mycobacterium tuberculosis*" del Código Sanitario para los Animales Terrestres de la OIE (2019).

A efectos del Código Terrestre, el MTBC comprende *M. bovis*, *M. caprae* y *M. tuberculosis*, pero excluye las cepas vacunales. El capítulo define el mecanismo por el cual un país o una zona se pueden considerar libres de infección por miembros del MTBC en bovinos y cérvidos, así como la forma de obtención del estatus en los rebaños.

En el caso de los países y/o territorios, éstos deberán (entre otros requisitos) cumplir con un programa de vigilancia en base a realización de pruebas diagnósticas regulares en todos los rebaños durante al menos tres años; las pruebas

deberán haber demostrado que, durante ese periodo, al menos el 99,8% de los rebaños que representen por lo menos el 99,9% de los bovinos del país o de la zona han estado libres de la infección causada por el MTBC.

Para que un rebaño de bovinos o cérvidos pueda calificarse como libre de la infección causada por miembros del MTBC, la enfermedad debe ser de declaración obligatoria en el país o territorio en el que está ubicado, no haberse detectado la infección en los últimos 12 meses, no haberse detectado sintomatología clínica ni lesiones *post mortem* compatibles y haberse efectuado dos pruebas con resultados negativos separadas por un intervalo mínimo de seis meses en todos los bovinos o cérvidos del rebaño de más de seis semanas de edad en el momento de las pruebas; la primera prueba deberá llevarse a cabo al menos seis meses después de retirar el último caso. Del mismo modo se incluyen requisitos en cuanto a la incorporación de animales y material genético.

El Código, anteriormente citado, también incluye el mecanismo de mantenimiento del estatus alcanzado tanto a nivel de país y/o territorio como a nivel de rebaño, así como las recomendaciones para las importaciones de bovinos, cérvidos y cabras, material genético, leche y productos lácteos de bovinos.

Por otro lado, también la OIE (2018), a través de su Manual de Diagnóstico, desarrolla las pautas concretas de diagnóstico de carácter oficial.

Base legal en la UE: contexto actual

En el seno de la UE, la política de erradicación se basa en dos pilares fundamentales (Reviriego Gordejo y Vermeersch, 2006): los Estados Miembros tienen la responsabilidad de erradicar la TB bovina y pueden recibir cofinanciación para el desarrollo del programa de erradicación; y la erradicación de la TB bovina en la UE es el objetivo final y los Estados Miembros deben disponer de una meta definida para lograrlo.

El marco reglamentario básico es la Directiva 64/432/CEE, de 26 de junio de 1964, y sus modificaciones, relativa a problemas de policía sanitaria en materia de intercambios intracomunitarios de animales de la especie bovina y porcina, que establece las pautas generales de actuación en los intercambios intracomunitarios de los animales de reproducción, producción o abasto de las especies bovina y porcina.

El objetivo prioritario de la Directiva es introducir un marco legal que garantice pautas generales en la erradicación de la TB bovina a través de la regulación del mecanismo de diagnóstico, de las pruebas autorizadas, de la regulación de las calificaciones sanitarias de una forma uniforme en todos los Estados Miembros de la Unión, y del establecimiento de los criterios para la obtención del estatus de

oficialmente libre en los distintos países y territorios. Esta Directiva supone pues la base de las garantías sanitarias frente a la TB que permiten el libre comercio de animales y productos de origen animal.

A semejanza a lo descrito en el caso internacional, la Directiva citada establece los criterios para obtención del estatus de oficialmente libre de un país y/o región. Es importante destacar que en el caso de España se recoge como unidad mínima con el reconocimiento del estatus (es decir, región) a la demarcación administrativa que corresponde con una provincia.

La calificación de oficialmente libre para un territorio se obtiene cuando el porcentaje de rebaños bovinos cuya infección con TB ha sido confirmada no ha superado el 0,1% anual de todos los rebaños controlados durante seis años consecutivos. Además de lo anterior, al menos un 99,9% de los rebaños deben haber conseguido el estatus de oficialmente indemne de TB durante seis años consecutivos, habiéndose procedido al cálculo de este último porcentaje el 31 de diciembre de cada año natural.

En el momento actual, las exigencias de calificación de territorios a nivel de la UE son más estrictas que las recogidas por la OIE en el Código Sanitario para los Animales Terrestres (OIE, 2019). En cambio, la calificación de rebaños como oficialmente indemnes se ajusta a los estándares internacionales.

Asimismo, es aplicable a nivel de la UE el denominado “paquete de higiene”, compuesto por los Reglamentos (CE) 852/2004, 853/2004 y 882/2004, y sus modificaciones, relativos a, respectivamente, la higiene de los productos alimenticios; la higiene de los alimentos de origen animal; y los controles oficiales para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales.

En este contexto legal, directamente relacionado con la seguridad alimentaria, se establecen requisitos claros en relación con la procedencia y posible destino de los productos de origen animal condicionado al estatus de TB del rebaño de origen.

La estrategia para erradicar la TB bovina integra una serie de medidas, a través de normas y documentos, tanto a nivel de la UE como a nivel nacional, apoyados sobre una base científica sólida. A nivel comunitario el Subgrupo de la TB Bovina de la Task Force (Task Force Subgroup DG SANTE) proporciona informes elaborados por grupos de expertos en la materia. Es destacable el documento: “Working Document on Eradication of Bovine TB in the EU”; la importancia del documento radica en que establece pautas concretas que deben seguir los Estados Miembros para alcanzar más rápidamente el objetivo de la erradicación de la enfermedad. Hay cuestiones que merece la pena destacar, como son la importancia de ajustar la Se diagnóstica a la situación

epidemiológica concreta, la necesidad de trabajar con el concepto de “unidad epidemiológica” y no sólo de rebaño, la integración de especies silvestres en la vigilancia, la implicación de los ganaderos como un pilar fundamental en la erradicación, y la necesidad de evitar la sobrecompensación ante los sacrificios obligatorios.

Este grupo de expertos “Task Force Subgroup” realiza visitas de evaluación *in situ* a los Estados Miembros y sus conclusiones sobre la situación de la enfermedad en el país son tenidas en cuenta a la hora de elaborar los distintos programas nacionales de erradicación de TB al objeto de ser cofinanciables, cuestión que también se debe regir por las guías elaboradas por la Comisión a través de distintos documentos (Guidelines for the Union co-funded programmes of eradication, control and surveillance of animal diseases and zoonoses for the years 2018-2020). En este sentido hay que destacar que existe una normativa específica que regula los mecanismos de contribución financiera de la Unión (Reglamento (UE) N° 652/2014 del Parlamento Europeo y del Consejo).

Base legal en la UE: futuro próximo

El Parlamento Europeo y el Consejo adoptaron en el año 2016 el Reglamento (UE) 2016/429 relativo a las enfermedades transmisibles de los animales y por el que se modifican o derogan algunos actos en materia de sanidad animal sobre enfermedades transmisibles de los animales (conocido como “Ley de sanidad animal europea”). El Reglamento se publicó en el Diario Oficial el 31 de marzo de 2016. El Reglamento entró en vigor el vigésimo día siguiente al de su publicación en el Diario Oficial de la UE y será aplicable a partir de 5 años desde su entrada en vigor.

La Ley de sanidad animal europea forma parte de un paquete de medidas propuesto por la Comisión Europea en mayo de 2013 para reforzar la aplicación de las normas de salud y seguridad para toda la cadena agroalimentaria (Figura 8). La Ley de sanidad animal es también un producto clave de la Estrategia de salud animal 2007-2013 (denominada “Prevenir es mejor que curar”), y viene a establecer un único marco jurídico para la sanidad animal basado en la categorización y priorización de enfermedades y medidas sanitarias, la potenciación de la prevención, la vigilancia y la preparación, así como la corresponsabilidad de los operadores, profesionales, autoridades y laboratorios y los sistemas de trazabilidad uniformes en línea a lo ya establecido.

En este nuevo marco jurídico la TB animal se ha categorizado como una enfermedad de “categoría B” (Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882 de la Comisión). Esto implica que debe controlarse en todos los Estados Miembros con el objetivo de erradicarla en toda la Unión.

Es importante destacar que la clasificación de la TB en la categoría B incluye la infección causada por miembros del MTBC (*M. bovis*, *M. caprae* y *M. tuberculosis*) en *Bison spp.*, *Bos spp.* y *Bubalus spp.* Además, el Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882, categoriza como de tipo “D” la infección causada por el complejo en los artiodáctilos distintos de *Bison spp.*, *Bos spp.* y *Bubalus spp.*, además de en éstos. Es decir, establece la necesidad de tomar medidas para evitar su propagación en relación con su introducción en la Unión o con desplazamientos entre Estados Miembros. Finalmente, categoriza como de tipo “E” la infección en los anteriores y en otros mamíferos terrestres, por lo que éstas especies deben someterse a vigilancia.

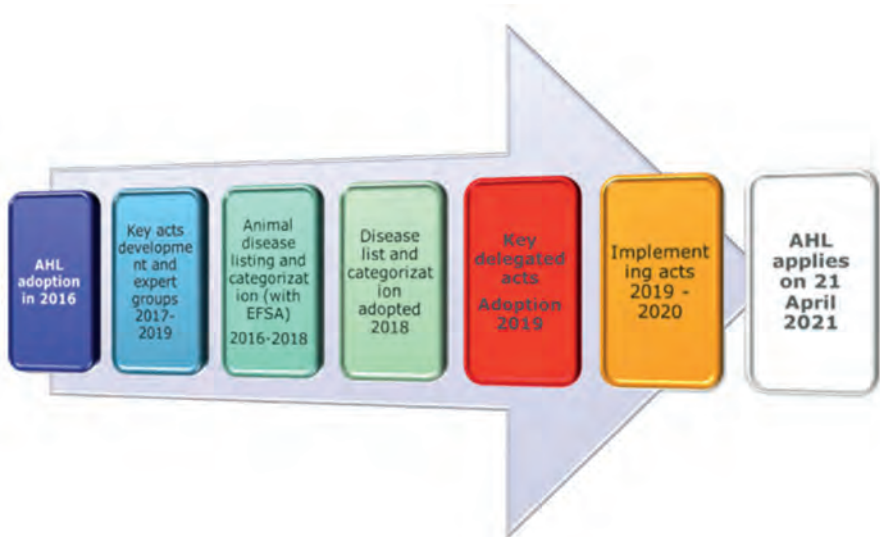


Figura 8. Desarrollo legislativo de la “Ley europea de sanidad animal”.

En el momento actual se han publicado los nuevos Reglamentos Delegados que desarrollarán los aspectos concretos que serán tenidos en cuenta para el diagnóstico, la obtención del estatus sanitario de oficialmente libre (tanto de países y/o regiones como de rebaños), las posibilidades de diagnóstico etc.

Base legal en España

A escala nacional, en el año 2003 se publicó la Ley 8/2003, de 24 de abril de sanidad animal en la que se desarrollan legalmente en España todos los mecanismos para vigilar y controlar las enfermedades de los animales, y para garantizar la salud pública y la seguridad alimentaria.

La citada Ley recoge (entre otras muchas cuestiones) las obligaciones de los particulares (artículo 7), dentro de las merece la pena destacar la siguiente: “aplicar y llevar a cabo todas las medidas sanitarias impuestas por la normativa vigente en cada caso, así como las medidas sanitarias obligatorias que se establezcan para prevenir las enfermedades de los animales o consentir su aplicación, así como poner los medios necesarios para que puedan realizar las citadas medidas con las debidas garantías de seguridad, tanto para los animales objeto de aquellas como para el personal que las ejecute”. Además desarrolla las medidas sanitarias de salvaguardia a adoptar para impedir la introducción y/o difusión de las enfermedades de declaración obligatoria.

La incorporación al ordenamiento jurídico nacional de la Directiva 64/432/CEE, se ha realizado a través de dos Reales Decretos: el Real Decreto 2611/1996, de 20 de diciembre, y sus modificaciones, por el que se regulan los Programas nacionales de erradicación de enfermedades de los animales y, el Real Decreto 1716/2000, de 13 de octubre, y sus modificaciones, sobre Normas sanitarias para el intercambio intracomunitario de animales de las especies bovina y porcina, que recoge en su anexo I la obtención, mantenimiento, suspensión y recuperación de las calificaciones sanitarias, así como los requisitos para el reconocimiento de regiones y países oficialmente indemnes de la enfermedad.

Adicionalmente, a nivel nacional se dispone de un Programa nacional de erradicación de TB bovina, de obligado cumplimiento, tal como se recoge en la Disposición Adicional segunda del Real Decreto 727/2011, de 20 de mayo, por el que se modifica el Real Decreto 2611/1996, de 20 de diciembre, por el que se regulan los Programas nacionales de erradicación de enfermedades de los animales.

La aprobación del Programa se realiza conforme a las directrices recogidas en el Real Decreto 1440/2001, de 21 de diciembre, por el que se establece el sistema de alerta sanitaria veterinaria. Este Real Decreto crea el Comité Nacional del Sistema de Alerta Sanitaria Veterinaria, con participación de todas las Comunidades Autónomas, entre cuyas funciones está estudiar las medidas para la erradicación y control de las enfermedades objeto de los programas nacionales de erradicación.

El Programa nacional de erradicación de TB bovina de España es aprobado por la Comisión. Esta aprobación implica la obtención de fondos y se ha materializado en 2020 mediante la Decisión nº SANTE/VP/2020/ES/SI2.823603, de 30 de enero de 2020. Así mismo se ha plasmado en el BOE mediante la Resolución de 2 de marzo de 2020, de la Dirección General de Sanidad de la Producción Agraria, por la que se publican los programas nacionales de erradicación, control y vigilancia de las enfermedades de los animales para el año 2020.

En el caso de España, además, se ha desarrollado un Plan de Acción frente a la TB en Especies Silvestres (PATUBES) que integra la vigilancia de la TB en la fauna silvestre (MAPA, 2017). Como desarrollo del PATUBES se ha publicado el Real Decreto 50/2018, de 2 de febrero, que establece la obligatoriedad (en determinadas circunstancias) de disponer de sistemas de gestión de subproductos de origen animal no destinados a consumo humano en las monterías de especies cinegéticas de caza mayor; y el Real Decreto 138/2020 de 28 de enero, por el que se establece la normativa básica en materia de actuaciones sanitarias en especies cinegéticas que actúan como reservorio de la TB. Ya se regulaban las pruebas previas al movimiento de animales de especies de fauna silvestre sensibles a TB a través del Real Decreto 1082/2009, de 3 de julio, por el que se establecen los requisitos de sanidad animal para el movimiento de animales de explotaciones cinegéticas, de acuicultura continental y de núcleos zoológicos, así como de animales de fauna silvestre.

Además, también existe una normativa estatal que recoge el baremo de indemnización aplicable en cada caso cuando se ordena el sacrificio obligatorio de los animales considerados positivos (Real Decreto 389/2011, de 18 de marzo, por el que se establecen los baremos de indemnización de animales en el marco de los programas nacionales de lucha, control o erradicación de la TB bovina, brucelosis bovina, brucelosis ovina y caprina, lengua azul y encefalopatías espongiiformes transmisibles, actualizado en al año 2017).

Finalmente, es importante mencionar que en España existe una normativa específica para regular determinados aspectos en la ejecución del Programa de TB en ganaderías de lidia (Real Decreto 186/2011, de 18 de febrero, por el que se regula la calificación sanitaria de las ganaderías y explotaciones de reses de lidia y el movimiento de los animales pertenecientes a las mismas).

De esta manera a nivel nacional la lucha contra la TB animal está regulada no sólo por el mecanismo normativo de actuación general, sino además por aspectos específicos a través del Programa nacional, los baremos de indemnización aplicables y la integración de la fauna silvestre en la lucha frente a la TB animal. Todo ello para disponer de un marco jurídico sólido que permita la consecución del objetivo de la erradicación de la TB animal en España.

3

Tuberculosis como zoonosis

José Manuel Benítez-Medina, Remigio Martínez,
Lucas Domínguez



Aspectos generales y magnitud del problema

La TB es una enfermedad infectocontagiosa tenaz y persistente que ha afectado a las poblaciones humanas durante milenios. El papel de la TB zoonótica es conocido desde la antigüedad e impulsó en los países desarrollados un cambio fundamental en el tratamiento de la leche, incorporando la pasteurización como medida preventiva. Cada año mueren 1,8 millones de personas en el mundo por TB, lo que la convierte en la principal causa de muerte debido a una enfermedad infecciosa (Dean et al., 2018). La mayoría de los casos de TB en personas están causados por *M. tuberculosis (sensu stricto)*, un agente patógeno, al igual que *M. africanum*, casi exclusivo de los seres humanos. Sin embargo, hay otros miembros del MTBC que, a pesar de infectar a un gran número de especies de mamíferos distintos del hombre, también pueden causar enfermedad en las personas. En consecuencia, se puede definir a la "TB zoonótica" como la afección humana causada por las especies (o variantes) del MTBC que están preferentemente adaptadas a los animales.

Aunque *M. tuberculosis* se reconoce como la primera causa de TB en humanos no se debe olvidar el papel que otras bacterias del MTBC tienen en la salud pública. En particular, se considera que la importancia de *M. bovis* como agente productor de TB en humanos está subestimada (Olea-Popelka et al., 2016). Las micobacterias tuberculosas que se han identificado hasta el momento como potencialmente zoonóticas son: *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti*, *M. pinnipedii* y *M. orygis* (van Ingen et al., 2012; Pérez-Lago et al., 2014). Aunque todas pueden causar TB en humanos, *M. bovis* es el agente zoonótico por antonomasia. A esto ha contribuido su capacidad de adaptación y propagación, al ser el miembro del MTBC que cuenta con mayor número de hospedadores. Así, además de ser el principal agente etiológico de la TB en el ganado bovino, *M. bovis* también puede infectar a otras muchas especies animales, tanto domésticas como silvestres (Gordon et al., 2009). Por este motivo, y dado que aún sigue siendo una

expresión ampliamente utilizada en la literatura científica, cuando en este capítulo nos referimos a “TB bovina”, lo haremos para designar de forma genérica al proceso patológico producido principalmente por *M. bovis* tanto en el ganado vacuno como en el resto de las especies animales susceptibles de infectarse; mientras que recurriremos a la fórmula “TB animal” para denominar a la afección animal causada por cualquiera de los miembros del MTBC.

Ante esta situación se elaboró la hoja de ruta para la TB zoonótica consensuada en la 48ª Conferencia Mundial de la Unión sobre Salud Pulmonar que tuvo lugar en Guadalajara (México) del 11 al 14 de octubre de 2017. A través de ella los cuatro socios en salud, la Organización Mundial de la Salud (OMS), la OIE, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Unión Internacional contra la TB y Enfermedades Respiratorias (La Unión), aunaron de esta manera sus fuerzas para desarrollar la hoja de ruta y abordar el impacto sanitario y económico de esta enfermedad.

Se trata de la primera hoja de ruta para combatir la TB animal (TB bovina de forma prioritaria) y su transmisión a los seres humanos, frecuentemente producida mediante el consumo (sin el tratamiento adecuado) de carne o productos lácteos. Estas actuaciones exigen una estrecha colaboración entre los que trabajan para mejorar la salud humana y la sanidad animal y ha sido desarrollada bajo el enfoque “Una sola salud” o “One Health”.

Conforme con los datos publicados por la OMS, se estima que más de 140.000 personas enferman y más de 12.000 personas pierden la vida cada año a causa de la TB zoonótica, sobre todo en las regiones de África y del Sudeste Asiático.

En el caso de la UE, los datos disponibles del año 2018 cifran en 170 los casos de TB humana causados por *M. bovis*, lo cual supone un 0,4% del total de casos de TB comunicados por 26 Estados Miembros de la UE. De esos 170 casos, 43 pertenecieron a España. Adicionalmente se notificaron 12 casos de infección causada por *M. caprae*, de los que 2 se detectaron en España (EU One Health Zoonoses Report, 2018).

Los datos anteriores, relativos a la UE, pueden subestimar el impacto real de la TB zoonótica en salud pública, ya que no siempre es sencillo extraer conclusiones de las investigaciones epidemiológicas. Además, el curso crónico de la enfermedad dificulta la posibilidad de centrar cronológicamente los casos.

En general, la TB zoonótica es un proceso que se transmite de forma indirecta, mediante el consumo de leche contaminada o productos lácteos elaborados a partir de esta —por ejemplo, queso fresco— que no se someten a tratamiento térmico. También se puede transmitir por el consumo de carne cruda o poco cocinada procedente de animales enfermos, aunque esta posibilidad es menos frecuente. Por otro lado, las personas que tienen alguna relación profesional

(ganaderos, veterinarios, trabajadores de mataderos...) con animales tuberculosos están especialmente expuestos al contagio de esta zoonosis (Vayr et al., 2018), ya que pueden adquirir la enfermedad de forma directa por vía aérea, mediante la inhalación de aerosoles infecciosos como consecuencia del contacto cercano y continuo con animales enfermos o productos de origen animal contaminados. Otra posible forma de contagio relacionada con la exposición ocupacional a la infección por *M. bovis* es la transmisión cutánea, a menudo asociada con heridas en la piel. Asimismo, de manera ocasional, se ha descrito la transmisión directa de *M. bovis* de persona a persona, tanto en pacientes inmunodeprimidos como en inmunocompetentes (Evans et al., 2007; Sunder et al., 2009; Etchechoury et al., 2010; Buss et al., 2016; Palacios et al., 2016).

La TB zoonótica representa, por tanto, una amenaza grave para la salud pública (Figura 9). Según las estimaciones de la OMS, en el año 2018 se produjeron 143.000 nuevos casos de TB zoonótica en el mundo y 12.500 personas murieron por esta causa (OMS, 2019). Sin embargo, las estimaciones de la carga mundial de TB zoonótica son imprecisas debido a la escasez de datos fiables por falta de sistemas de vigilancia sanitaria en la mayoría de los países, principalmente aquellos en los que la TB bovina es endémica y la capacidad de sus laboratorios es limitada para aislar y diferenciar *M. bovis* de *M. tuberculosis*. En este contexto, el verdadero peso de la TB zoonótica sigue siendo desconocido, en especial en países de bajos ingresos, por lo que es una enfermedad claramente subestimada (Pérez-Lago et al., 2014).



Figura 9. Infografía sobre la amenaza que representa la tuberculosis zoonótica. https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Bovine_tuberculosis/E_FINAL%20INFOGRAPHIC_1.pdf

Resulta conveniente destacar que los programas de control de la TB bovina se implantaron precisamente para reducir el riesgo que entrañaba esta enfermedad para las personas (Robinson, 2019). Los éxitos logrados en el control de la afección en el ganado, junto a las medidas para controlar e higienizar los productos procedentes de animales con sospecha de infección (inspección en mataderos y pasteurización de la leche), han contribuido a que la incidencia anual de casos de TB zoonótica en los países desarrollados haya disminuido de manera considerable en las últimas décadas (Hlavsa et al., 2008), mientras que la incidencia es mayor en los países donde los recursos son insuficientes para implantar programas de control de la TB bovina (Müller et al., 2013). En la UE, por ejemplo, los esfuerzos realizados con las campañas de saneamiento ganadero, junto con la implantación de tratamientos térmicos de la leche y de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano, han propiciado que la TB zoonótica sea un proceso poco frecuente. Así, como se ha comentado anteriormente, en el año 2018 solo se notificaron 170 casos confirmados de TB causada por *M. bovis* en seres humanos en los 26 Estados Miembros de la UE, que representan una pequeña proporción (0,4%) del total de casos de TB en personas. Por su parte, España registró en ese año 43 casos humanos de TB por *M. bovis*, más 2 casos por *M. caprae* (EFSA y ECDC, 2019); y aunque se asume de forma generalizada que tanto *M. bovis* como *M. caprae* son menos virulentos que *M. tuberculosis* en el hombre, y existe un menor riesgo de transmisión entre personas, se ha demostrado fehacientemente que esta transmisión es posible, lo que incrementa la necesidad de controlar esta zoonosis.

Además de la trascendencia zoonótica, la TB bovina tiene una notable importancia económica. Esta enfermedad supone en los países en desarrollo una amenaza para el bienestar de las comunidades cuya subsistencia depende del ganado, al reducir la producción de carne y leche e impedir el aprovechamiento de las canales y las partes afectadas que no son aptas para el consumo humano (OMS et al., 2017). Si a las potenciales pérdidas en la producción ganadera se suma que la TB bovina obstaculiza el comercio internacional de animales y sus productos, queda plenamente justificado el hecho de que, en los países desarrollados, sea la enfermedad infecciosa en la que se han invertido más medios y dinero para su control y erradicación (de Benito et al., 2005). Eso sí, el coste económico de la erradicación puede ser tan elevado que algunos autores incluso han cuestionado los beneficios de tales medidas (Torgerson y Torgerson, 2010); aunque las evidencias científicas respaldan la idea de que, si se tienen en cuenta todos los beneficios, incluidos los sociales, el esfuerzo para controlar o erradicar la TB bovina resulta efectivo al reducir la prevalencia de la enfermedad, por lo que resulta económicamente viable y vale la pena hacerlo (Caminiti et al., 2016).

A pesar del carácter zoonótico y la importancia económica de esta enfermedad, durante mucho tiempo, el intercambio de información entre las autoridades

de salud pública y sanidad animal ha sido ineficaz, debido a la ausencia de una estrategia común. Afortunadamente, esta situación se está corrigiendo en los últimos años, al haberse reconocido la necesidad de abordar de una manera global e integradora los desafíos actuales que sigue planteando esta zoonosis.

Tuberculosis, una enfermedad en un mundo con una sola salud

Negacionismo zoonósico: historia de una recidiva

Algunos científicos, entre ellos Robert Koch, creían que los seres humanos eran inmunes a la infección causada por el agente etiológico de la TB bovina y, por lo tanto, que ésta no representaba ninguna amenaza para las personas. No fue hasta 1970 cuando se aceptó de manera oficial a *M. bovis* como una especie bacteriana distinta de *M. tuberculosis*, ya en la primera década del siglo XX existía un consenso generalizado de que la TB bovina era un proceso originado por una bacteria distinta de la que causaba la TB humana, y que su agente causal podía infectar a las personas (Domínguez, 2011).

De hecho, las medidas adoptadas para evitar la transmisión de la TB animal a los seres humanos constituyen el espaldarazo definitivo para el nacimiento de la Veterinaria de Salud Pública. Gracias al excelente trabajo de Griffith para la «Royal Commission on Tuberculosis» en 1907, que corrobora los estudios de Kenkle (1797), Smith (1898) y Ravenel (1902) entre otros, se acepta que la TB que afectaba al ganado bovino era un proceso contagioso que podía ser transmitido a otras especies de animales (incluyendo primates) y también a personas. A partir de entonces, se establece el peligro para la salud humana de los productos derivados de los animales enfermos de TB y se considera a lecherías, carnicerías y establos como zonas de riesgo potencial para la salud pública, prohibiéndose la venta de leche y carne proveniente de vacas infectadas (Domínguez, 2011).

No obstante, los primeros intentos por establecer programas de control de la TB en el ganado bovino no estuvieron exentos de polémica, generándose un intenso debate entre los profesionales que se mostraban a favor, por los beneficios sanitarios, y los que se posicionaban en contra de su implantación, por las pérdidas económicas que ocasionaban (Benítez-Medina, 2015). Así, por ejemplo, en 1917, Estados Unidos implantó un controvertido programa de erradicación basado en el diagnóstico de la TB con tuberculina y el sacrificio obligatorio de los reaccionantes positivos (*test-and-cull strategy*), sin una compensación total de las pérdidas a los ganaderos (Olmstead y Rhode, 2004). Esto representó un concepto muy novedoso, ya que los dueños de los animales infectados sufrían una expropiación basada en criterios de salud pública. A pesar de la controversia suscitada, no cabe duda de que el programa tuvo un enorme éxito, pues en 1941 la

prevalencia había descendido desde el 5% (10% en el ganado lechero) a menos del 0,5%. Además, se estima que los ganaderos, que en un principio fueron muy reacios, percibieron unos retornos económicos 10 veces superiores a la inversión. Y lo que es más importante, la TB humana de origen zoonótico era para entonces prácticamente inexistente, estimándose que el programa permitió entre 1917 y los años precedentes a la Segunda Guerra Mundial salvar más de 25.000 vidas al año. Este programa fue básicamente el que de forma progresiva se fue implantando en Europa con 20-30 años de diferencia, y se aplicó en España a partir de 1965. La implantación del programa de erradicación se complementó con la obligatoriedad de la inspección de la carne en mataderos y la pasteurización de la leche. Tal es la importancia de esto último, que la pasteurización se considera como uno de los éxitos de la salud pública más importantes de la historia y uno de los avales para continuar y profundizar en la inspección y el control de los alimentos que ha hecho posible reducir significativamente la diseminación de las enfermedades infecciosas de los animales al hombre (Domínguez, 2011).

Este relato histórico, que no debería ser más que un conjunto de acontecimientos pasados, tiende a reaparecer de forma recurrente después de algún tiempo de aparente calma, cual recidiva tuberculosa. Por ello, resulta sorprendente comprobar cómo en el año 2020, con una pandemia causada por un nuevo coronavirus (SARS-CoV-2) que probablemente tiene un origen zoonótico, aún queden escépticos que niegan el riesgo para la salud pública de la TB bovina. Más si cabe cuando es evidente que los países que llevan décadas implementando programas de erradicación, y a su vez promoviendo la adopción de las prácticas higiénico-sanitarias anteriormente mencionadas, han conseguido reducir notablemente la incidencia de la enfermedad tanto en el ganado como en los seres humanos (de la Rúa-Domenech, 2006).

Por tanto, si se atiende única y exclusivamente a criterios científicos, la discusión concluye en este punto. Sin embargo, se debe recurrir de modo ineludible al conocimiento científico para aclarar esta cuestión: ¿qué pasaría si se atendieran las reclamaciones de algunos profanos y se dejaran de aplicar con el mismo rigor las campañas de saneamiento ganadero? La respuesta es, en sí misma, más simple que la propia interrogación, pues solo hay que contemplar lo que ocurre en algunos países europeos, que tuvieron la enfermedad prácticamente erradicada en el reservorio bovino y que, por no mantener adecuados programas de vigilancia y contención, en este momento sufren un auténtico descontrol de la enfermedad, tanto en los reservorios animales (doméstico y silvestre) como en el humano.

De igual modo, este paradigma es un sarcasmo para las regiones donde la enfermedad es endémica y los recursos son insuficientes para implantar programas de erradicación. Así, por ejemplo, se estima que en África se producen

cada año alrededor de 70.000 casos de TB zoonótica (Müller et al., 2013). Otro dato más, según las estimaciones de la OMS, es que en 2018 murieron 9.100 personas de TB por *M. bovis* en África, mientras que en Europa solo fueron 91 (OMS, 2019).

Evidentemente, la dificultad para acceder a un tratamiento adecuado en los países en vías de desarrollo es una de las razones de semejante desproporción en la mortalidad asociada a la enfermedad. No obstante, la TB zoonótica plantea por sí misma desafíos para el tratamiento eficaz y la recuperación de los pacientes, como demuestra un estudio estadounidense donde se determinó que las personas infectadas por *M. bovis* tenían el doble de probabilidad de morir durante el tratamiento que los pacientes infectados por *M. tuberculosis* (Rodwell et al., 2008). En general, *M. bovis* presenta una resistencia natural a la pirazinamida, uno de los cuatro antibióticos de primera línea utilizados actualmente en la terapia antituberculosa recomendada por la OMS —isoniacida, rifampicina, pirazinamida y etambutol diarios durante dos meses, y en los cuatro meses siguientes, solo isoniacida y rifampicina, también diarios—. Dado que la mayoría de los profesionales de la salud inician el tratamiento sin disponer de los resultados de un antibiograma, los pacientes con TB zoonótica están expuestos a recibir un tratamiento inadecuado. Esto puede conllevar un fracaso terapéutico, con la posible aparición de recidivas o el desarrollo de resistencia a otros fármacos antituberculosos. De hecho, ya se ha detectado la presencia de cepas de *M. bovis* resistentes a la isoniacida y la rifampicina. El proceso causado por cepas resistentes a estos dos medicamentos se conoce como “TB multirresistente”, y representa una importante amenaza mundial para la salud humana (OMS et al., 2017). Conviene recordar que en España ya se ha padecido este problema, con casos humanos de TB en la década de 1990 que se caracterizaron por una alta mortalidad y cuyo agente etiológico fue una cepa multirresistente de *M. bovis*, la cual ha seguido detectándose posteriormente de forma esporádica (Samper et al., 1997, 2005; Palenque et al., 1998; Rivero et al., 2001; Romero et al., 2006).

Además, si dramáticas son las consecuencias negativas que se producen directamente por la infección del agente patógeno, no lo son menos las que se derivan por la muerte de los animales, pérdidas de producción de alimentos, decomisos, etc., en países donde no sobran los recursos. No olvidemos que la definición de zoonosis de la OIE incluye como un grave quebranto para la salud pública aquellas enfermedades que impactan seriamente en la producción, en particular en los países en desarrollo, ya que los problemas de producción y de disponibilidad alimentaria cuantitativa y cualitativa conducen también a graves problemas de salud pública, y la TB claramente las produce (Ejeh et al., 2014).

En definitiva, es de esperar que estas razones sean suficientes para la conversión a la causa tuberculosa, tal y como afirman cuatro de los mayores expertos en TB del planeta en el prefacio de la *Hoja de ruta contra la tuberculosis zoonótica*, «es hora de realizar un esfuerzo contundente y concertado para abordar definitivamente el efecto de la infección por *M. bovis* sobre la salud y el bienestar de personas y animales».

Plan de actuación contra la tuberculosis zoonótica

La repercusión de la TB zoonótica se extiende más allá del ámbito de la salud pública, y la carga de la enfermedad humana no se podrá reducir si no se mejoran los niveles de seguridad alimentaria y se controla la TB bovina en su reservorio animal (Dean et al., 2018). Por ello, la OMS, la OIE, la FAO y la Unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias, lanzaron de manera conjunta la primera hoja de ruta para combatir la TB zoonótica en octubre del año 2017. Este plan de actuación se basa en el enfoque *One Health* (Una sola salud), que reconoce la interdependencia de la salud humana, la sanidad animal y el medio ambiente (Figura 10), y aboga por la participación de todos los sectores y disciplinas pertinentes para afrontar los principales desafíos sanitarios y económicos de esta enfermedad (OMS et al., 2017).



Figura 10. Infografía basada en el enfoque One Health para acabar con la tuberculosis. https://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Animal_Health_in_the_World/docs/pdf/Bovine_tuberculosis/E_FINAL%20INFOGRAPHIC_2.pdf

Esta hoja de ruta identifica las líneas prioritarias para hacer frente a la TB zoonótica en el ser humano y a la TB bovina en animales. Se agrupan en tres temas centrales: i) mejorar las bases de la evidencia científica al recopilar datos más completos y precisos, mejorar el diagnóstico en las personas y abordar las brechas de investigación; ii) reducir la transmisión en la interfaz hombre-animal garantizando alimentos más seguros, mejorando la salud animal y reduciendo el riesgo para las personas; iii) fortalecer los enfoques intersectoriales y colaborativos aumentando la conciencia, el compromiso y la colaboración, desarrollando políticas y directrices, implementando intervenciones conjuntas y abogando por la inversión (Dean et al., 2018).

A pesar de la publicación de la *Hoja de ruta contra la tuberculosis zoonótica*, muchas personas siguen cuestionándose si la TB bovina representa realmente un problema o si existe una manera mejor de controlar la enfermedad. Estas preguntas han motivado la redacción de un artículo de revisión en el que se explica por qué la estrategia basada en las pruebas diagnósticas utilizadas hasta ahora ha tenido éxito; por qué la TB bovina era y sigue siendo un grave problema de salud pública; y por qué reducir la carga de TB bovina, además de ser necesario para salvar vidas y asegurar medios de vida, es demasiado importante y urgente como para esperar el posible desarrollo de “mejores” pruebas diagnósticas antes de afrontar de forma decidida este problema (Good et al., 2018), o lo que es peor, dejar de abordarlo y retroceder al pasado.

Consideraciones clínicas sobre la tuberculosis zoonótica

En la mayoría de las personas la infección por *M. bovis* se caracteriza por el aislamiento y la contención, ya que el sistema inmunitario es capaz de controlar la multiplicación bacteriana y, en los estadios iniciales, no suele haber signos ni síntomas clínicos de la enfermedad. En una pequeña proporción de las personas infectadas, esa contención falla y se produce la enfermedad activa; ya sea en los dos primeros años desde que tuvo lugar la primoinfección (TB primaria) o más tarde (TB posprimaria) por la reactivación de la infección latente (Lawn et al., 2011). La reactivación endógena de una infección adquirida en el pasado suele ser la causa más probable de la enfermedad en la mayoría de los casos de TB zoonótica en países desarrollados como España, ya que lo normal es que sean pacientes de edad avanzada, en muchos casos con un estatus inmune alterado, en los que la infección pudo ocurrir incluso antes de la implantación de los tratamientos térmicos de la leche y de las campañas oficiales de saneamiento ganadero (Benítez-Medina, 2015).

Cuando se desarrolla TB activa, la localización de la enfermedad, la gravedad y la resolución del proceso son muy variables. La TB, con independencia del agente

etiológico, puede desarrollarse en prácticamente cualquier órgano. No obstante, debido a que *M. bovis* a menudo se ingiere a través de alimentos contaminados, muchos de los casos tienden a involucrar localizaciones extra-pulmonares. En un estudio longitudinal realizado en la Toscana italiana durante cuatro años se identificó *M. bovis* como el agente causal del 3,7% de las TB extra-pulmonares y del 1% de los casos pulmonares (Lari et al., 2009). Las manifestaciones de la TB extra-pulmonar dependen del órgano afectado. Las adenopatías cervicales representan la forma más frecuente de presentación entre las TB extra-pulmonares (Ayele et al., 2004), y fueron muy comunes en Europa en niños hasta que se logró el control de la TB bovina en la cabaña ganadera y se generalizó la pasteurización de la leche y la vacunación con BCG. Actualmente, es un proceso extremadamente raro en la población infantil autóctona, pero puede presentarse en inmigrantes originarios de países donde la TB bovina no está controlada y la ingestión de leche sin pasteurizar es habitual (Alfayate et al., 2009). Como ejemplo, *M. bovis* causa fundamentalmente lesiones extra-pulmonares en el hombre en países en vías de desarrollo (Cosivi et al., 1998), y un estudio realizado en Tanzania detectó que un 10% de las TB extra-pulmonares estaban causadas por esta micobacteria.

En definitiva, según las evidencias científicas, y más allá de la disputa que pueda existir en el ámbito de la ciencia en torno al tema tratado en este capítulo, es incuestionable que, debido a su carácter zoonótico, la TB bovina es un problema de salud pública. De hecho, no será posible conseguir el objetivo mundial para 2050 de reducir la enfermedad humana a menos de un caso por millón de habitantes, si de forma simultánea no se logra reducir la TB animal a escala global. Por ello, es necesario continuar trabajando en línea con el concepto One Health, promoviendo la cooperación entre todas las partes interesadas, con el único objetivo de seguir avanzando en la complicada tarea de erradicar una enfermedad que llevamos padeciendo durante milenios.

En lo referente a nuestro país, durante bastante tiempo el flujo de información entre las autoridades de salud pública y sanidad animal ha sido ineficiente debido a la ausencia de una estrategia común entre ambos sectores. Afortunadamente, esta situación se está revirtiendo en los últimos años ya que el control de las zoonosis resulta altamente beneficioso tanto para el hombre como para los animales (Domínguez y Bezos, 2014).

4

Avances en investigación



4.1. Epidemiología

4.1.1. Caracterización molecular y secuenciación masiva

Víctor Lorente, Pilar Pozo, Julio Álvarez, Beatriz Romero, Lucía de Juan

La caracterización molecular de los agentes causales de la TB en animales se basa en el uso de técnicas capaces de identificar variaciones genéticas que permitan la diferenciación entre aislados identificados como miembros del MTBC.

El genoma de las especies del MTBC está compuesto por aproximadamente 4,4 millones de pares de bases (pb). Sin embargo, las especies y cepas del MTBC son relativamente similares entre sí en términos genéticos, agrupándose en poblaciones altamente clonales. A pesar de ello, existen distintos elementos genéticos [variación en el número de secuencias repetitivas, pérdida de regiones de diferenciación, presencia de secuencias específicas, polimorfismos de un único nucleótido (SNPs), etc.] que han surgido durante la evolución y adaptación de estos patógenos a sus distintos hospedadores y ambientes, diferenciándolos en especies o genotipos. El estudio combinado de estas variaciones genéticas ha permitido establecer la estructura poblacional de *M. bovis* a nivel mundial, a través de los denominados complejos clonales, es decir, genotipos con unas características comunes y específicas. Además, las poblaciones bacterianas incluidas en estos complejos se pueden subdividir, encontrándose estos genotipos más o menos distribuidos geográficamente.

En las últimas décadas se ha producido un auge en la aplicación de distintas técnicas moleculares para caracterizar los aislados microbiológicos procedentes de poblaciones infectadas o del medio ambiente, dando lugar a la disciplina de la epidemiología molecular. Por lo tanto, la información genética de cada uno de los aislamientos se incorpora como factor fundamental para estudiar los determinantes y distribución de la TB animal.

Esta metodología se basa inicialmente en la PCR, que se emplea para amplificar de manera específica la secuencia de los distintos espaciadores presentes en un aislado. Una vez amplificados, se realiza una hibridación en una membrana de nailon que contiene unos oligonucleótidos complementarios a los espaciadores de interés, colocados en filas paralelas. De los más de 100 espaciadores distintos conocidos, tan solo 43 se emplean extensamente en la caracterización de especies del MTBC (Kamerbeek et al., 1997). Cuando las secuencias amplificadas entran en contacto con sus oligonucleótidos complementarios, son capturadas y su presencia o ausencia es detectada mediante un proceso de revelado en una película radiográfica. La presencia o ausencia de los espaciadores se registra empleando un sistema binario (0 como ausente y 1 como presente) generando de esta manera el perfil de 43 espaciadores. Con el fin de simplificar este código binario único y comparar los resultados, se asigna un código de seis dígitos (SB seguido de cuatro números) generado en la base de datos internacional mbovis.org (www.mbovis.org), que se corresponderá con el espoligotipo del aislado en estudio (por ejemplo, SB0121: 1101111101111101111011111111111111110000). Se trata de una técnica sencilla, rápida y robusta, motivos por los cuales es ampliamente utilizada en muchos laboratorios del mundo. Aunque inicialmente se desarrolló para caracterizar cepas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* en seres humanos, su uso se extendió a los aislados de origen animal, permitiendo demostrar la transmisión de la TB animal entre ganado doméstico y especies silvestres, y describir la variabilidad poblacional a nivel geográfico. Durante la evolución de las especies del MTBC, la recombinación genética en el *locus* DR ha resultado en la duplicación o eliminación (nunca ganancia) de algunos de los DVRs. Por lo tanto, la ausencia de determinados espaciadores permite:

- 1) Identificar las principales especies incluidas en el MTBC. Por ejemplo, todos los aislados de *M. caprae* siempre tienen ausentes al menos, los espaciadores 1, del 3 al 16, y del 39 al 43;
- 2) Distinguir los distintos genotipos (espoligotipos) dentro de una especie concreta.

Sin embargo, la discriminación de esta técnica varía en función de la diversidad genética que presenten los aislados de una especie concreta como por ejemplo *M. bovis*. En los casos en los que esta diversidad es escasa, debido a la sobre-representación de unos pocos perfiles mayoritarios, la resolución que ofrece esta técnica puede verse comprometida. Esta situación puede mejorarse empleando un panel extendido de espaciadores, además de los 43 más comunes (van Embden et al., 2000; van der Zanden et al., 2002) o mediante otra técnica molecular alternativa como el análisis de múltiples *loci* con un número variable de copias repetidas en tándem (MLVA).

Análisis del número variable de repeticiones en tándem (MIRU-VNTR)

En los genomas de las especies del MTBC existen multitud de secuencias repetidas en tándem, denominadas secuencias satélite. Muchas de estas secuencias presentan variabilidad relacionada con el número de repeticiones (*Variable Number Tandem Repeat*, VNTR). La mayoría de los VNTRs encontrados en el MTBC se corresponden con las llamadas unidades de repetición intercaladas en el genoma de las micobacterias (MIRUs). Se trata de secuencias repetidas en tándem de unas 40-100 pb que se encuentran dispersas en el genoma de las micobacterias, generalmente en zonas intergénicas (Supply et al., 1997; Frothingham y Meeker-O'connell, 1998; Skuce et al., 2002). Aunque se considera que estas secuencias son bastante estables dentro del genoma de una misma cepa, con el tiempo pueden ocurrir pequeñas variaciones, ya sea una ganancia o pérdida de la secuencia repetida, a través de un fenómeno conocido como microevolución. La técnica que se emplea para analizar las distintas localizaciones cromosómicas (*loci*) de los VNTRs se conoce como análisis de VNTRs en múltiples *loci* o MLVA. Al igual que el espoligotipado, esta técnica se basa en la PCR, por lo que se emplean una serie de cebadores específicos de los distintos *loci* a estudiar. Tras la amplificación del fragmento se emplean dos metodologías para conocer el número de copias de cada *locus*: la electroforesis en geles de agarosa, donde el tamaño (pb) de la banda indica el número de repeticiones, o la electroforesis capilar (Figura 12). El perfil genético de MIRU-VNTR vendrá dado por el número de repeticiones identificado para cada uno de los *loci* en estudio.

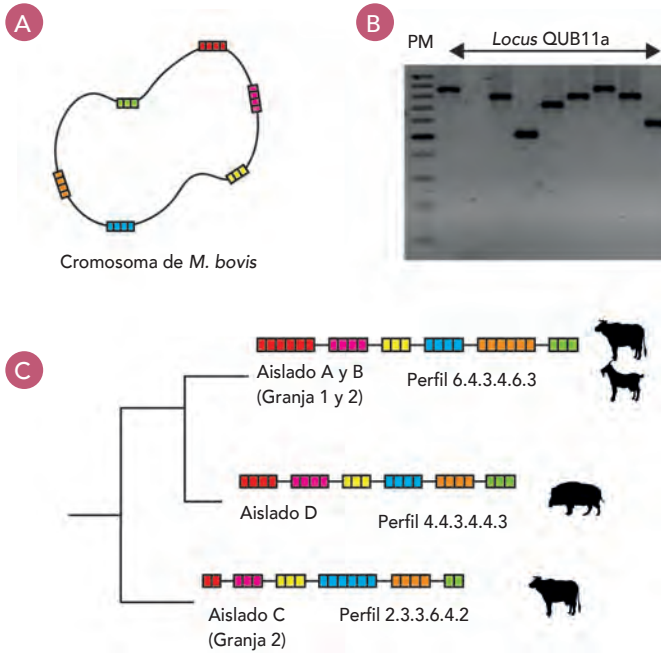


Figura 12. Caracterización molecular mediante MIRU-VNTR.

A) Gráfico de seis MIRU-VNTRs (recuadros en color) distribuidos a lo largo del genoma micobacteriano. B) Visualización de resultados del *locus* QUB11a en un gel de agarosa tras la amplificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Cada banda representa un aislado y la distancia migrada se correlaciona con el número de repeticiones. PM: marcador de peso molecular. C) Relaciones filogenéticas entre distintos aislados de *Mycobacterium bovis* según el número de repeticiones de cada uno de los MIRU-VNTRs analizados. Las figuras animales han sido tomadas de Macrovector.

Durante años la comunidad científica se ha centrado en buscar distintos *loci* variables en los genomas de las especies del MTBC con el fin de definir un panel común de VNTRs que pueda emplearse para diferenciar aislados del MTBC. Inicialmente, los estudios de MIRU-VNTRs se centraron en *M. tuberculosis*. Esto dio lugar a la definición de un panel de 9, 12 o 24 *loci* para la mayoría de estudios epidemiológicos en TB humana, permitiendo su estandarización a nivel internacional (Supply et al., 2006). Sin embargo, este panel incluye algunos *loci* que no discriminan los aislados de *M. bovis* y excluyen otros que aportan mucha variabilidad. Por ese motivo, la mayoría de los estudios a nivel europeo se han centrado en al menos 6 *loci* de los 24 mencionados anteriormente: VNTR 3232, ETR-A, ETR-B, QUB 11a, QUB 26 y MIRU 4 (Supply, 2005). Al igual que sucede en TB humana, no todos los VNTRs son necesarios en primera instancia, pudiendo elegirse unos u otros en función del objetivo del estudio, la variabilidad esperada entre aislados, la localización geográfica, etc. Por otra parte, existen muy pocos

estudios centrados en *M. caprae* (Prodinger et al., 2005) y otras especies del MTBC, pero suelen emplearse los mismos *loci* que para *M. bovis*. La selección de uno o varios paneles estandarizados para las distintas especies del MTBC aisladas en animales, así como la estandarización de la forma de representar los resultados obtenidos es una tarea pendiente en la comunidad científica que requiere estudios adicionales.

Secuenciación masiva de genomas

De todas las metodologías disponibles para caracterizar a los microorganismos y, concretamente, a las especies del MTBC, la secuenciación masiva de genomas (del inglés, *Whole Genome Sequencing*, WGS) es indudablemente la que más posibilidades ofrece. La WGS se refiere a un conjunto de técnicas laboratoriales que permiten conocer la composición genética completa (por ejemplo, genómica) de un individuo. Mediante equipos altamente especializados y automatizados se llevan a cabo millones de reacciones de secuenciación en paralelo, generándose así grandes cantidades de datos en muy poco tiempo. Al contrario de lo que sucede con las técnicas moleculares convencionales, en las que se analizan pequeñas porciones del genoma de manera visual a través de membranas, columnas cromatográficas o geles de agarosa, la secuenciación masiva de genomas se fundamenta en el análisis (bio)informático, a partir de los datos de secuencia generados por distintas reacciones químicas o fisicoquímicas durante la secuenciación. Tras el proceso de secuenciación se procede a la unión de las secuencias o lecturas entre sí para reconstruir el genoma completo del organismo en cuestión. Para ello se pueden emplear dos aproximaciones; el ensamblado basado en el uso de genomas de referencia y el ensamblado *de novo*. En el primer caso, las distintas lecturas se alinean con aquellas partes de un genoma de referencia que presentan mayor similitud. La repetición de este paso con cada una de las secuencias genera poco a poco una réplica del genoma de referencia que incluye aquellas variaciones características del aislado que se está analizando. El ensamblado *de novo*, por otra parte, realiza este proceso de unión tan solo analizando la similitud de secuencia entre las propias lecturas, sin necesidad de emplear un genoma de referencia. Las uniones de las lecturas en fragmentos de gran tamaño se conocen como *cóntigos* (*contigs*). La unión de estos *cóntigos* en fragmentos de mayor tamaño puede dar lugar al cromosoma completo del microorganismo o, de existir partes desconocidas entre estos, a *super*cóntigos (Figura 13).

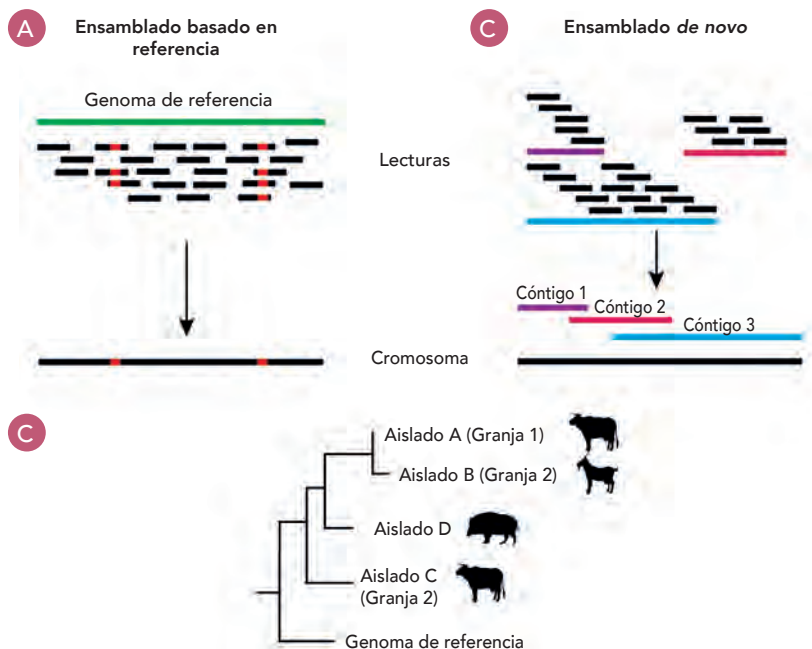


Figura 13. Análisis de variaciones genéticas mediante secuenciación masiva de genomas.

A) Mapeado: las lecturas se alinean frente a un genoma de referencia (verde) y las diferencias (en rojo) son incluidas en la reconstrucción. B) Ensamblado *de novo*: las lecturas se alinean unas con otras para dar lugar a cóntigos, que de ser contiguos podrán dar lugar al cromosoma bacteriano. C) Relación filogenética entre los aislados al comparar los genomas obtenidos mediante secuenciación masiva.

Una vez se conoce la secuencia completa, o en su defecto una parte mayoritaria de ésta, pueden detectarse las diferencias genéticas existentes entre distintos aislados mediante una serie de algoritmos bioinformáticos. Debido a la sencillez de su análisis, las más empleadas son los SNPs. Sin embargo, en función del objetivo del estudio pueden emplearse otras mutaciones como por ejemplo deleciones o inserciones. Dado que es posible analizar cientos o miles de posiciones a la vez, se consigue una mayor resolución que con las técnicas moleculares descritas previamente, permitiendo establecer relaciones filogenéticas mucho más precisas. Además de detectar diferencias de secuencia entre aislados, existen cientos de aplicaciones distintas para los datos genómicos, pudiendo emplearse algoritmos bioinformáticos para determinar la composición génica de un genoma, detectar factores de virulencia, genes de resistencia a antibióticos, marcadores genéticos, etc. Estos algoritmos pueden emplearse para mejorar e incluso imitar a las técnicas moleculares, permitiendo, por ejemplo, reproducir los resultados obtenidos por la técnica del espigotipado. La combinación de datos genómicos y epidemiológicos, así como el uso de modelos estadísticos, permiten una comprensión más profunda

de las estructuras poblacionales de TB, establecer relaciones filogenéticas entre aislados y conocer los distintos factores genéticos y ambientales involucrados en su diseminación y adaptación. Por ello, la WGS es una técnica con grandes perspectivas de futuro que será clave en el proceso de erradicación de la TB.

Bases de datos

Para poder vigilar y controlar la distribución de las especies del MTBC en animales es necesario recopilar toda la información de interés epidemiológico, como puede ser la localización geográfica, la especie animal de la cual se aisló el microorganismo o el genotipo (espoligotipo, perfil VNTR, etc.). Pero de nada sirve esta información si no está disponible o no se puede acceder a ella de manera rápida y sencilla, por lo que es fundamental desarrollar bases de datos desde donde los usuarios puedan consultarla y emplearla en sus estudios epidemiológicos. Existen varias bases de datos donde se recopilan datos epidemiológicos y moleculares de las especies del MTBC. Desde el punto de vista de la Sanidad Animal, Mbovis.org (Smith y Upton, 2012) es la base de datos más importante a nivel internacional. Su principal función es la asignación de una nomenclatura estandarizada a nivel internacional para todos los aislados de MTBC de origen animal. Es de libre acceso e incluye mapas sobre el país que reporta un nuevo espoligotipo. Otras bases de datos ampliamente empleadas como SITVIT2 (Couvin et al., 2019) o MIRU-VNTRplus (Allix-Beguec et al., 2008; Weniger et al., 2010), contienen datos sobre aislados procedentes en su mayoría de casos clínicos en seres humanos. A nivel nacional cabe destacar la importancia de mycoDB.es, una base de datos que nació a partir de la colaboración entre el antiguo Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, y el Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) de la Universidad Complutense de Madrid en el año 2008. En esta base de datos se recopilan una serie de datos epidemiológicos y moleculares de cada aislado del MTBC (*M. bovis* y *M. caprae*, principalmente) obtenido en España. Estos datos incluyen la especie animal de origen, la localización geográfica, el año de aislamiento, el perfil de espoligotipado y el perfil de MIRU-VNTR si está disponible. Esta base de datos contiene registros desde 1996 y, hasta el momento, incluye más de 47.000 aislados, 564 espoligotipos y 182 perfiles de MIRU-VNTR. Existen distintas herramientas de búsqueda para personalizar la consulta de los datos, permitiendo así combinar varios parámetros como la especie animal de donde se aisló, la Comunidad Autónoma, provincia o municipio, el año de aislamiento, la especie del MTBC y/o el espoligotipo (Figura 14). Además, estas búsquedas se presentan con un visor geográfico en un mapa de España que facilita la visualización de los mismos. Mientras que Mbovis.org y las otras bases de datos son de uso público, mycoDB.es está restringida a los servicios veterinarios y laboratorios oficiales que participan en los programas nacionales de erradicación de la TB bovina.

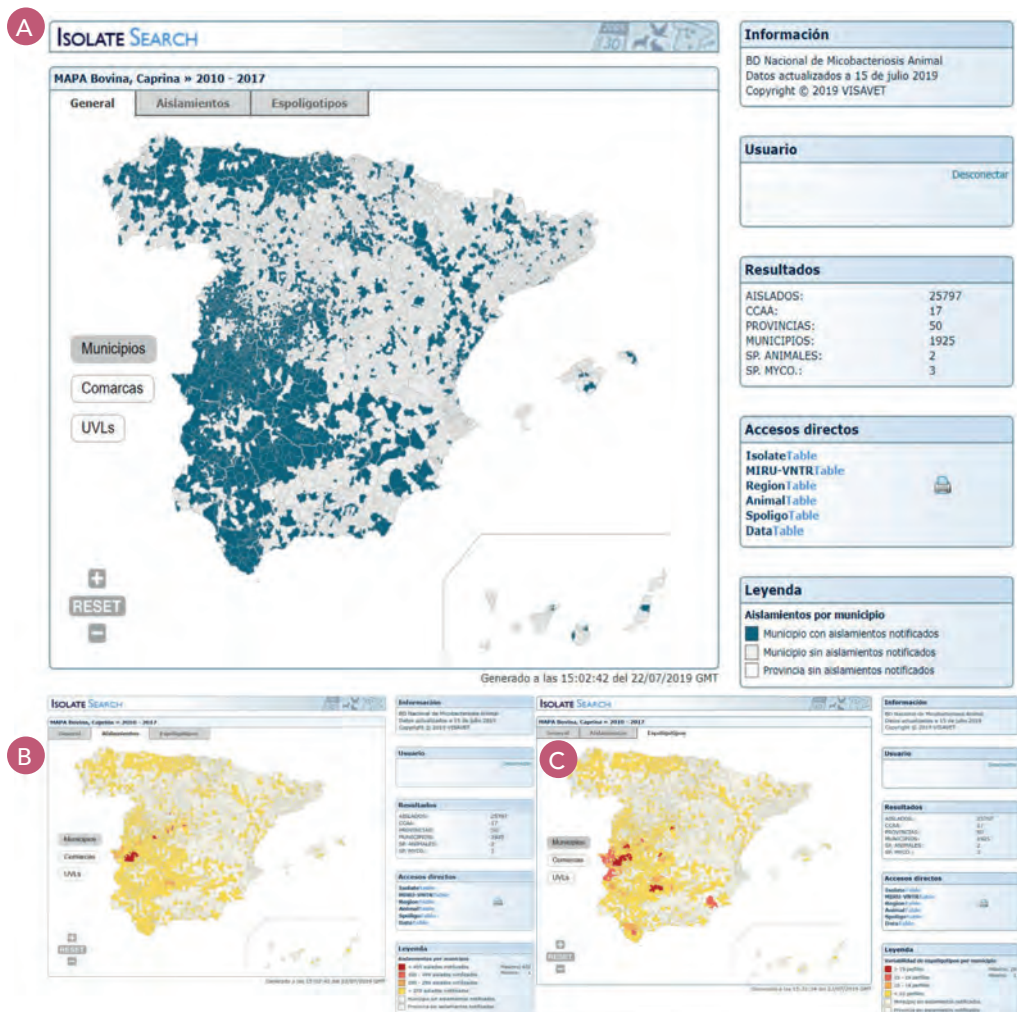


Figura 14. Ejemplo de consulta de aislados de bovino y caprino, entre 2010 y 2017, en la base de datos mycoDB.es.

- A) Visualización general de resultados por municipio.
- B) Visualización en función del número aislamientos por municipio.
- C) Visualización en función de la variabilidad de espoligotipos por municipio.

Estudios de epidemiología molecular en tuberculosis

El desarrollo y la aplicación de las técnicas moleculares mencionadas anteriormente han supuesto un gran avance en el conocimiento de la distribución y prevalencia de *M. bovis* y otras especies del MTBC en todo el mundo. A nivel nacional, los primeros estudios de epidemiología molecular sobre TB animal se realizaron empleando la técnica del espoligotipado. La detección de los mismos

espoligotipos en animales domésticos y silvestres (jabalí, ciervo y gamo) procedentes de una misma área geográfica permitió establecer la importancia de estos últimos en el mantenimiento de la TB bovina (Aranaz et al., 2004; Gortázar et al., 2005; Romero et al., 2008). La ausencia de contacto con ganado bovino en 10 o 20 años en determinadas explotaciones cinegéticas infectadas sugirió la existencia de un ciclo de mantenimiento de la enfermedad en la población silvestre (Gortázar et al., 2005). El análisis de los perfiles de espoligotipo a gran escala en Europa indicó que, a excepción de Reino Unido, existe una gran variedad de espoligotipos (Haddad et al., 2001; Duarte et al., 2008; Boniotti et al., 2009; Rodríguez et al., 2010). En España, el análisis mediante espoligotipado de más de 6.000 aislados de *M. bovis* obtenidos entre 1992-2007 identificó 15 perfiles mayoritarios, con una frecuencia de aparición superior al 1% respecto al total de espoligotipos, y una amplia distribución geográfica, que representaron el 77% de los aislados (Rodríguez et al., 2010). Cuatro de éstos representaron más de la mitad (55%) de los aislados; SB0121 (27,9%), SB0134 (11,2%), SB0339 (8,1%) y SB0265 (6,3%). Además de aislarse en bovino, éstos también se aislaron en al menos una especie silvestre, resaltando la importancia de la fauna silvestre en la epidemiología de esta enfermedad. La prevalencia de estos espoligotipos entre 2008 y 2017 en España fue similar a la anteriormente mencionada (datos no publicados).

En 2011 se demostró que la alta diversidad en la distribución de TB animal en España no se limita solo a las producidas por *M. bovis*, sino que *M. caprae* también se asocia a un elevado riesgo para el ganado bovino y las especies silvestres, representando un 7,4% del total de aislados del MTBC recuperados entre 1992 y 2009 en diferentes áreas geográficas de España (Rodríguez et al., 2011). Esta especie, altamente patógena para el ganado caprino, tuvo como máximo representante en este estudio al SB0157 (60%), seguido de SB0416 (22%) sobre el total de aislados en ganado doméstico y especies silvestres. La presencia de los mismos espoligotipos en varios países sugiere una relación directa entre ellos, pudiendo tratarse de brotes con un vínculo epidemiológico reciente o la existencia de un ancestro fundador de todas ellas que, posteriormente, se expandió por la geografía, manteniendo su genoma casi idéntico. Así, el SB0121, característico del complejo clonal Eu2 y el perfil más frecuente en España y Portugal (Duarte et al., 2008; Rodríguez et al., 2010), fue el segundo espoligotipo más frecuente en Francia (Haddad et al., 2001) y se situó entre los 5 más frecuentes en Italia (Boniotti et al., 2009). La limitada capacidad discriminatoria del espoligotipado y la existencia de perfiles de espoligotipo mayoritarios complica en algunas situaciones la trazabilidad de los brotes mediante esta técnica a nivel nacional e internacional.

Debido a las limitaciones discriminatorias del espoligotipado, se realizaron diversos estudios en Europa que combinaban esta técnica con el multi-locus VNTR analysis (MLVA) (Allix et al., 2006; Duarte et al., 2010; Rodríguez-Campos et al.,

2013; Hauer et al., 2016), donde quedó patente su mayor capacidad discriminadora. Un estudio de 2013 realizado en España con 115 aislados del espoligotipo SB0121 identificó 65 genotipos distintos empleando un panel de 9 MIRU-VNTRs (Rodríguez-Campos et al., 2013). La aplicación de estos mismos VNTRs en 15 granjas con el mismo espoligotipo, detectaron genotipos distintos en 14 de ellas. En función de la mayor o menor variabilidad entre el número de repeticiones de los VNTRs, se han podido señalar, respectivamente, posibles nuevas infecciones a través de fuentes externas (Rodríguez-Campos et al., 2013) o reinfecciones por cepas persistentes (Navarro et al., 2016).

El uso del espoligotipado y el MLVA para estudiar casos clínicos de TB zoonótica en humanos ha demostrado las ventajas del empleo conjunto de estas técnicas, así como de la colaboración entre las distintas administraciones (Salud Pública y Sanidad Animal) en investigaciones epidemiológicas. Así, se ha visto que los espoligotipos más frecuentes en bovino también se aíslan en humanos (Rodríguez et al., 2009; Navarro et al., 2016; Palacios et al., 2016). Por otra parte, la combinación del MLVA y datos epidemiológicos permitió identificar posibles transmisiones recientes de animales a humanos, e incluso transmisiones humano-humano (Navarro et al., 2016). Aun así, de la misma forma que sucede con el espoligotipado, en determinadas situaciones de baja variabilidad genética, el uso del MLVA puede ser insuficiente debido a una elevada similitud entre los genotipos. En estos casos puede ser difícil discriminar entre posibles infecciones nuevas y fenómenos de microevolución en aquellos casos donde únicamente existen pequeñas diferencias en uno o dos de los *loci* estudiados (Rodríguez et al., 2010; Navarro et al., 2016). Estudios recientes en Francia indican que los MIRU-VNTRs podrían tener una capacidad discriminadora distinta en función del complejo clonal, lo cual podría requerir el uso de paneles de MIRU-VNTRs adaptados a la situación de cada país (Hauer et al., 2016). Por ello, la elección adecuada del panel MIRU-VNTR sigue siendo clave a la hora de garantizar una adecuada resolución epidemiológica, por lo que es recomendable emplear aquellos *loci* que presentan mayor variabilidad. Por otra parte, el análisis de un mayor número de posiciones en el genoma mediante WGS se ha convertido en una alternativa muy interesante en el estudio de la TB. El uso de la secuenciación masiva en estudios epidemiológicos es cada vez más frecuente, gracias en gran medida al desarrollo de herramientas de procesado de *Big Data* a través de la computación en la nube. Sin embargo, aunque los costes se han visto reducidos en los últimos años, éstos siguen siendo elevados por lo que su uso está limitado a unos pocos laboratorios a nivel internacional. Los principales avances en el uso de la secuenciación masiva en TB proceden de Estados Unidos (Bruning-Fann et al., 2017; Salvador et al., 2019), Reino Unido (Biek et al., 2012) y Nueva Zelanda (Price-Carter et al., 2018), aunque recientemente otros países europeos como Francia (Hauer et al., 2019) y Alemania (Broeckl et al., 2017) se han sumado al uso de esta metodología.

La secuenciación masiva es, sin duda, la metodología que mayor discriminación de aislados ofrece en investigaciones epidemiológicas de TB y se ha implantado como una herramienta adicional en el control de esta enfermedad en Reino Unido y Estados Unidos. En Irlanda del Norte, el análisis de aislados de *M. bovis* con el mismo perfil de VNTR procedentes de ganado bovino y tejonos de cinco granjas cercanas permitió distinguir aislados aparentemente idénticos y definir agrupaciones de los mismos. Estudiando el perfil de SNPs fueron capaces de encontrar indicios claros de reinfección de una misma explotación por un mismo linaje que había sido capaz de persistir en el entorno, así como identificar posibles introducciones de nuevos linajes (Biek et al., 2012). Por otra parte, el empleo de la WGS en la investigación epidemiológica de un brote de TB en Minesota demostró la similitud genética de aislados procedentes de poblaciones de ganado bovino y ciervo, así como con unos aislados procedentes de un brote en Tejas en 2012. Mediante un modelo bayesiano señalaron un posible ancestro común para ambos brotes en 1990, aunque fueron incapaces de determinar el grado con el que esta cepa había circulado en Estados Unidos o Méjico (Glaser et al., 2016). La aplicación de WGS a gran escala puede ser extremadamente útil para comprender la estructura poblacional de *M. bovis* en los distintos países afectados, permitiendo conocer la variabilidad existente dentro de los genotipos mayoritarios presentes en un país. La secuenciación masiva ha permitido dividir los genotipos predominantes en Francia en distintas agrupaciones en función de diferencias en el perfil de SNPs (Hauer et al., 2019). Aunque en general los agrupamientos coincidían con los genotipos descritos anteriormente mediante espoligotipado y MLVA, se detectaron algunas incongruencias, como la agrupación de algunos aislados del SB0134 con los aislados del SB0120. La similitud en el perfil de SNPs entre estos aislados indica que se produjo la delección de los espaciadores 4 y 5 en algunos aislados de este grupo, dando lugar al perfil SB0134. El resto de aislados del SB0134 analizados en el estudio se encontraban en una agrupación bastante separada del grupo del SB0120, indicando que, de haberse realizado este análisis únicamente con el espoligotipado, la relación epidemiológica habría pasado desapercibida.

En escenarios epidemiológicos complejos en los que múltiples especies hospedadoras podrían intervenir en el mantenimiento y transmisión de la TB animal, la WGS puede emplearse para determinar el grado de importancia que tienen unas especies frente a otras en el ciclo de la enfermedad y el riesgo que suponen para el ganado bovino. Esto fue ejemplificado en Michigan (Estados Unidos), donde el principal hospedador silvestre de *M. bovis* es el ciervo de cola blanca, aunque también se ha aislado del uapití (ciervo canadiense). El análisis retrospectivo de aislados procedentes de bovino, ciervo y uapití durante más de 15 años sugirió que, entre las distintas especies recogidas en ese periodo, la probabilidad de transmisión de *M. bovis* era mayor entre los ciervos y el ganado bovino

y, considerablemente inferior, entre los uapití y el ganado bovino (Salvador et al., 2019). De esta manera, se ofrece información valiosa a las autoridades veterinarias sobre dónde concentrar sus esfuerzos y mantener el control de las poblaciones con mayor importancia epidemiológica.

Aunque las técnicas moleculares convencionales han supuesto grandes avances en nuestro conocimiento acerca de la epidemiología de la TB en nuestro país, el uso de la WGS es escaso, aunque ya se está implantando en varios laboratorios. Los ejemplos anteriores indican que puede ser una herramienta crucial para entender la distribución y transmisión de este patógeno dentro de nuestras fronteras. Sin duda, es fundamental analizar los perfiles de SNPs de los genotipos mayoritarios en España, determinados mediante las técnicas de espoligotipado y/o VNTRs, para hacerse una idea definitiva acerca de la estructura poblacional de *M. bovis* en nuestro país, permitiendo así identificar nuevas relaciones epidemiológicas antes desconocidas. Por otra parte, conocer la variabilidad genómica de los aislados dentro de los rebaños y estudiar las relaciones filogenéticas entre aislados procedentes de ganado doméstico y fauna silvestre será de gran utilidad para identificar reinfecciones o nuevas introducciones y permitirá a las administraciones afinar sus medidas de control en las explotaciones. El ensamblado *de novo* de los genomas puede emplearse para identificar genes diferenciales entre aislados procedentes de animales domésticos o silvestres, y describir los posibles factores que determinan el éxito adaptativo y geográfico de determinados aislados frente al resto. A su vez, la obtención de los genomas de estos aislados puede permitir identificar nuevos marcadores moleculares, como deleciones e inserciones, que puedan servir para desarrollar nuevos métodos diagnósticos y mejorar nuestro conocimiento acerca de la evolución y epidemiología de esta enfermedad infecciosa.

4.1.2. Modelos de transmisión

Pilar Pozo, Julio Álvarez, Alberto Allepuz, Giovanna Ciaravino

A pesar de que la aplicación de los modelos matemáticos para estudiar las dinámicas de las enfermedades en medicina humana se remonta a los siglos XVIII y XIX, su utilidad en el marco de las ciencias veterinarias tuvo su apogeo durante el brote de fiebre aftosa de Gran Bretaña en el año 2001. Durante esta epidemia se recogieron una gran cantidad de datos (por ejemplo, localización geográfica de las granjas, tipo productivo, tamaño y movimientos de ganado entre las mismas) que permitió reconstruir la cadena de transmisión de la enfermedad. Esto permitió a su vez explorar el impacto de la diversidad de las poblaciones involucradas

en el curso de una epidemia, y su importancia en el diseño de programas de control. La epidemia de fiebre aftosa de 2001 demostró así la utilidad de los modelos matemáticos de simulación para estudiar las dinámicas de infección de las enfermedades animales y la evaluación de posibles medidas de control. A partir de este momento, su aplicación ha sido cada vez más frecuente.

Sin embargo, y a pesar de que estos modelos han demostrado ser muy útiles para predecir el patrón de diseminación y desarrollar planes de contingencia frente a enfermedades como la influenza aviar altamente patógena o la peste porcina africana (Liu et al., 2008; Barongo et al., 2016), existe una gran controversia en relación a su capacidad para predecir de manera certera los eventos de una epidemia, debido en gran medida a la elevada cantidad de supuestos en los que se basan. Un ejemplo de ello es el caso de algunos modelos predictivos desarrollados para estudiar la epidemia del virus del Ébola en el oeste de África en 2014, cuyas predicciones sobrestimaron enormemente el número de pérdidas humanas que finalmente fueron registradas (WHO Ebola Response Team, 2014). Aunque la predicción a través de modelos nunca será perfecta, los modelos de transmisión representan una herramienta útil para poder cuantificar el grado en el que las medidas de control pueden cambiar la trayectoria de una enfermedad, o identificar supuestos incorrectos sobre la epidemiología de la misma (Christley et al., 2013).

Tipos de modelos de transmisión

De entre las numerosas definiciones de “modelización” (refiriéndose al uso y aplicación de modelos) podemos destacar la ofrecida por Thrusfield en su manual de epidemiología veterinaria, “una representación de procesos físicos —reales— con el fin de incrementar nuestra comprensión de los mismos” (Thrusfield, 2007). Así, un modelo de transmisión imita o simula el comportamiento de un proceso —biológico en nuestro caso— de modo que facilita su estudio, haciendo dicho estudio más accesible y económico.

Los modelos de transmisión pueden ser clasificados atendiendo a múltiples criterios, si bien una de las clasificaciones más básicas es la que los divide en modelos determinísticos, aquellos en los que la enfermedad siempre se transmite de la misma manera porque se asume que todos los parámetros que determinan la evolución de la enfermedad en la población son fijos; y estocásticos (o probabilísticos), que complican los anteriores al incluir eventos aleatorios; por lo tanto, los resultados no están dados por valores fijos predeterminados sino que pueden variar en función de la probabilidad de ocurrencia de los eventos. Por ejemplo, en un modelo probabilístico, la incubación de una enfermedad puede oscilar entre 6 y 9 meses, mientras que en un modelo determinístico el periodo de incubación será siempre 7,5 meses. Los modelos determinísticos son por tanto más sencillos, y suelen ser los primeros en usarse al estudiar una enfermedad. La naturaleza

estocástica (es decir, la variabilidad) intrínseca a la mayor parte de fenómenos biológicos (incluyendo la transmisión de enfermedades) hace, no obstante, que los modelos estocásticos, en los que los parámetros usados son variables, permitan capturar con mayor fiabilidad el proceso de diseminación de las enfermedades (Vynnycky y White, 2010).

Los modelos de transmisión de enfermedades animales se basan en otro supuesto, el de "mezcla homogénea de los individuos de la población", de modo que cada animal tiene la misma probabilidad de contacto con todos los animales del rebaño. Este supuesto de mezcla homogénea puede, no obstante, incumplirse (debido a existencia de subgrupos dentro de un rebaño, por ejemplo, terneros y animales adultos), de modo que el uso de dichos modelos puede conducir a sobreestimaciones de la velocidad de diseminación de una enfermedad. Por ello, se han desarrollado también modelos más complejos que tienen en cuenta la heterogeneidad en los contactos entre individuos (o explotaciones, si se simula la diseminación de una enfermedad entre distintas granjas en una región, por ejemplo), lo que puede dar lugar a estimaciones más precisas y más acordes a la realidad. Esta heterogeneidad puede tener su origen en diferentes fuentes, como puede ser la edad del animal, el sexo, la localización en el espacio o el comportamiento de los animales, entre otras.

Los dos tipos de modelos de transmisión principalmente empleados para el estudio de la epidemiología de las enfermedades son: (i) modelos basados en individuos, los cuales estudian el comportamiento de cada individuo en particular; y (ii) modelos compartimentados, los cuales dividen la población en diferentes grupos o "categorías" según ciertas características (por ejemplo, edad) o posibles estados de salud/infección, sin distinción entre individuos dentro del mismo grupo. Dichos estados son excluyentes entre sí, es decir, cada individuo solo puede pertenecer a uno de ellos en cada periodo de tiempo (Vynnycky y White, 2010). De entre éstos el modelo de Reed-Frost, en el que la evolución de los individuos se sigue en "generaciones" (los individuos infectados en la generación t luego constituyen la fuente de la infección de otros individuos en la generación $t+1$) fue uno de los primeros modelos compartimentados en ser desarrollados.

En los modelos compartimentados, el acrónimo del modelo suele indicarnos el número de estados por los que pasan los individuos; por ejemplo, en un modelo compartimentado SIR, los individuos transitan entre tres estados: susceptibles (S), infectados (I) y retirados (R) (por inmunidad o muerte). La elección de los estados en un modelo depende de las características de la enfermedad estudiada (Vynnycky y White, 2010). Además, estos modelos pueden complicarse incorporando otros parámetros, como por ejemplo una modificación de las fuentes de transmisión en función de la localización (para incluir por ejemplo transmisión a partir de reservorios silvestres), las entradas y salidas de animales de la población

(por nacimientos, muertes o movimientos de animales), o la aplicación de pruebas diagnósticas que conduzcan a la eliminación de animales (infectados o no infectados).

En el estudio de las distintas estrategias de control de las enfermedades infecciosas, una de las aplicaciones más interesantes de los modelos ha sido la estimación de un parámetro teórico llamado número reproductivo básico (R_0). Este parámetro proporciona cierta información acerca de la velocidad con que una enfermedad puede propagarse en una determinada población y, por lo tanto, representa una herramienta muy útil para estudiar brotes o para evaluar el efecto de las medidas de control. El número reproductivo básico se define como el número de infecciones secundarias causadas por un único individuo infectado en una población enteramente susceptible (Anderson y May, 1991). De esta manera, si $R_0 = 1$ (valor umbral), la infección estará en equilibrio, manteniéndose constante (endémica); si el $R_0 < 1$, la infección se autolimitará hasta erradicarse (reducción del número de individuos infectados); por el contrario, si el $R_0 > 1$, entonces la infección se propagará.

Aplicaciones de los modelos de transmisión en el estudio de la tuberculosis

La epidemiología de la TB bovina, como la de otras enfermedades infecciosas crónicas de difícil diagnóstico y con un prolongado periodo de incubación, es difícil de estudiar. Así, resulta muy complejo diseñar estudios, ya sean observacionales o experimentales, que permitan responder de manera fiable a preguntas tales como cuál es el periodo habitual desde el momento en el que un animal se infecta hasta que pueda ser detectado o pueda actuar como fuente de infección para otros animales, cuál es el número de casos secundarios derivados de la introducción de un único animal infectado al rebaño o cuál tendría que ser la Se mínima de una técnica diagnóstica para poder erradicar la enfermedad de una explotación en un periodo de tiempo determinado. En este contexto, los modelos matemáticos de simulación ofrecen una alternativa muy valiosa para resolver algunas de estas incógnitas, a pesar de los desafíos y las incertidumbres asociados a la propia enfermedad que dificultan el diseño de estos modelos.

Multitud de estudios han aplicado modelos de transmisión para estudiar diferentes aspectos de la epidemiología y el control de la TB bovina. Entre los objetivos de los estudios publicados en los últimos 20 años, destacan las siguientes aplicaciones:

- Estimación de los parámetros de transmisión de la TB entre animales dentro de un rebaño infectado (transmisión intra-rebaño): la tasa de transmisión entre animales y la duración del periodo desde que se produce la infección hasta que es detectada mediante las técnicas diagnósticas.

- Estimación de la tasa de transmisión entre diferentes rebaños (transmisión inter-rebaño) a través de distintas vías (por ejemplo, movimientos de animales, contactos entre animales de granjas vecinas o contacto con fauna silvestre).
- Estudio del impacto de distintos factores (infecciones residuales en el rebaño, fauna silvestre, uso de pastos comunales y proximidad a granjas vecinas) en la incidencia y persistencia de la enfermedad.
- Valoración de la fiabilidad (Se y especificidad [Sp]) de las técnicas diagnósticas utilizadas en el marco del programa de erradicación.
- Evaluación del impacto de la incorporación de medidas alternativas de control y vigilancia a los programas de erradicación.

A continuación, se resumen algunos de los resultados más interesantes derivados del uso de modelos de transmisión en los últimos años.

Estimación de los parámetros de la transmisión de la tuberculosis dentro de un rebaño bovino

La transmisión de la TB entre animales dentro de un rebaño es un fenómeno clave y de extrema complejidad en la epidemiología de la enfermedad. Los parámetros que definen la dinámica de dicha transmisión han sido extensamente estudiados a lo largo de las últimas décadas. Algunos autores han empleado estudios experimentales; si bien estos estudios permiten un mayor control de los animales (momento de infección, momento de excreción, etc.) su elevado coste y dificultad obliga a realizarlos con un pequeño número de animales. Además de ello, resulta muy difícil realizar una infección experimental que sea equivalente a la infección natural, por lo que la validez de los resultados presenta numerosas limitaciones (de la Rúa-Domenech et al., 2006; Álvarez et al., 2012a; Conlan et al., 2012). Otros autores han empleado estudios observacionales, basándose en el análisis de datos de campo y en la estimación de la fecha más probable de infección a partir de la información disponible. Sin embargo, la dificultad de estimar esta fecha con precisión junto a diferentes factores que pueden condicionar la transmisión (estado inmune de los animales, presencia de reservorios silvestres infectados, rebaños colindantes infectados, adquisición de animales infectados, dosis infectiva, susceptibilidad del hospedador, etc.) da lugar a una elevada variabilidad en las estimaciones obtenidas.

Con frecuencia, en el estudio de la TB en bovino, la dinámica de la transmisión intra-rebaño se aborda a través de modelos de simulación. Los modelos de simulación capturan la dinámica temporal de transmisión de la TB a través de

la representación de los diferentes estados biológicos que atraviesa un animal infectado por TB (Álvarez et al., 2014a). En la literatura se han propuesto varios tipos de modelos, como por ejemplo aquellos basados en la fórmula de Reed-Frost (Pérez et al., 2002; Álvarez et al., 2012b), modelos basados en individuos (Fischer et al., 2005) y modelos compartimentados (Barlow et al., 1997; Conlan et al., 2012; Smith et al., 2013; Brooks-Pollock et al., 2014; Ciaravino et al., 2018). Todos los modelos propuestos consideran la existencia de un estado susceptible (S), en el que están todos los animales sanos que pueden infectarse, y un estado infeccioso (I), en el cual los animales infectados pueden infectar a otros animales susceptibles. Entre éstos, algunos modelos consideran otros dos estados, definidos por la capacidad de los animales de transmitir la enfermedad y/o de reaccionar a las pruebas diagnósticas (Figura 15). Durante la primera fase del periodo de latencia, antes de que el animal sea infeccioso y también antes de que la infección de lugar a una respuesta inmune detectable en las pruebas diagnósticas, se encuentra el estado oculto (O). A continuación, existe un estado reactor (R) en el que los animales infectados ya pueden ser detectados, aunque todavía no serían infecciosos.

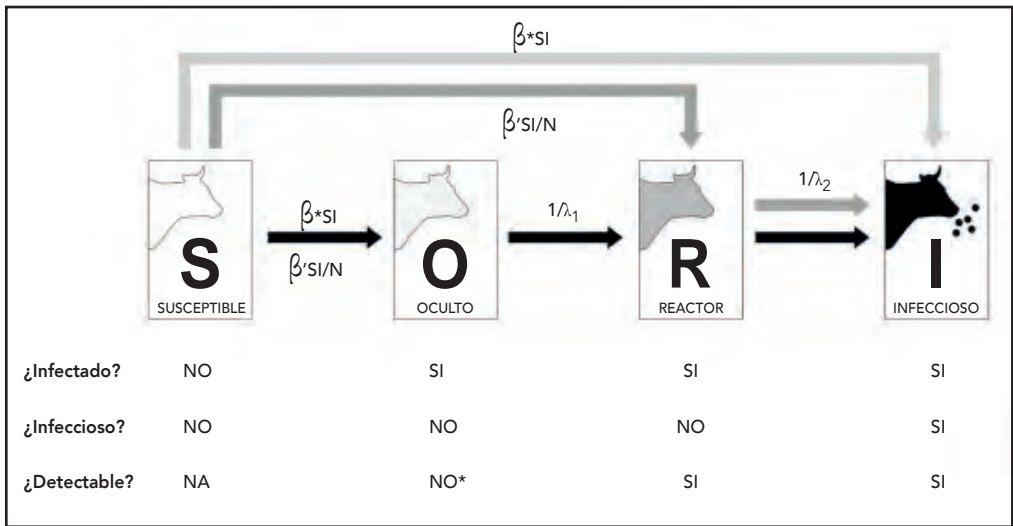


Figura 15. Estructura de los modelos para la simulación de la transmisión intra-rebaño de la tuberculosis animal. Las líneas negra, gris oscuro y gris claro indican los estados de transición en los modelos "SORI", "SRI" y "SI", respectivamente. λ_1 y λ_2 representan la duración estimada de los periodos oculto y reactor, mientras que β^* y β' se refieren a los coeficientes de transmisión en los modelos densidad- y frecuencia-dependientes, respectivamente. Adaptado de Álvarez et al. (2014a).

Los individuos transitarán por los diferentes estados en función de una serie de parámetros. El primero de dichos parámetros es el coeficiente de transmisión (β), que cuantifica el número de nuevos animales infectados (O) a los que dará lugar un animal infeccioso (I) por unidad de tiempo, y que es, por tanto, un reflejo de la tasa de contacto entre los individuos (a mayor contacto, mayor transmisión), la probabilidad de que dicho contacto derive en una nueva infección (a mayor probabilidad, mayor transmisión) y la duración del periodo infeccioso. El número de nuevos casos que se esperarán será, por tanto, una función del coeficiente de transmisión y del número (o densidad) de animales susceptibles e infecciosos, de modo que cuanto mayor sea S e I (y β), mayor será el número de animales que pasarán del estado S al O (Figura 15). Los animales permanecerán en el estado O durante el periodo λ_1 hasta que aparecen los primeros signos detectables de la enfermedad (en este caso la reacción a las pruebas diagnósticas). Siendo ya detectable en las pruebas, el animal pasa al estado de reactor, en el que permanecerá un periodo λ_2 hasta que empiece a excretar la bacteria y pase por fin al estado infeccioso.

Los parámetros de la transmisión intra-rebaño de la TB reportados son bastante variables; por ejemplo, VanderWaal y colaboradores (VanderWaal et al., 2017), basándose en datos publicados en la literatura científica en los últimos veinte años, estimaron un valor más probable de la duración del periodo oculto de 3,3 meses (mín. 0,5 meses, máx. 17,2 meses) y un valor más probable de la duración del periodo reactor de 6 meses (mín. 3 meses, máx. 36 meses), donde los amplios rangos obtenidos reflejan la diversidad de los resultados en las diferentes publicaciones. Esta variabilidad puede explicarse en parte por la variabilidad intrínseca de los procesos de transmisión (por ejemplo, susceptibilidad del hospedador o la dosis infectiva), por el tipo de modelo utilizado y por las asunciones que se hagan sobre otros factores que pueden condicionar la transmisión (por ejemplo, estado inmune considerado, presencia de reservorios silvestres infectados, rebaños colindantes infectados, adquisición de animales infectados, etc.). Además, también el tipo y la calidad de los datos disponibles pueden afectar las estimaciones; los datos analizados pueden no reflejar adecuadamente la complejidad de la TB en el conjunto de la población, o incluso, puede suceder que los datos no contengan la precisión necesaria para realizar una estimación precisa. En la Tabla 2 se muestra un ejemplo de la diversidad de estas estimaciones, indicando el tipo de estudio con el que han sido obtenidas y el tipo de modelo utilizado.

Tabla 2. Parámetros de transmisión intra-rebaño de la tuberculosis en bovinos estimados en distintos estudios basados en el uso de modelos.

Parámetro	Valor (rango)	Tipo de modelo	Referencia
Tiempo desde la infección hasta detección λ_1 (días)	22 (14-22)	SORI	Barlow et al., 1997
	43,9	SORI	Kao et al., 1997
	41 (30-54)	SE1E2RIa	Fischer et al., 2005
	1,8 (0,0-7,7)	SOR	Conlan et al., 2012
	275 (24-517)	SORI	Conlan et al., 2012
	44 (14-44)	SER1a	Smith et al., 2013
	101 (15,3-525)b	SORI	VanderWaal et al., 2017
Tiempo desde la detección hasta excreción λ_2 (meses)	6 (3-9)	SORI	Barlow et al., 1997
	34,6	SORI	Kao et al., 1997
	8,3 (6,3-25)	SORI	Fischer et al., 2005
	6 (3-36)b	SORI	VanderWaal et al., 2017
Periodo de latencia (tiempo desde la infección hasta excreción) $\lambda_1 + \lambda_2$ (meses)	24 (15-34)	SRI	Pérez et al., 2002
	13,3 (4-27)	SORI	Conlan et al., 2012
	27	SE1a	Rossi et al., 2015
	3,2	SOMRnl	Ciaravino et al., 2018
Coeficiente de transmisión β (por vaca y año)	2,23	SRI	Pérez et al., 2002
	5,2	SORI	Fischer et al., 2005
	2,3	SRI	Álvarez et al., 2012a
	5,2	SOMRnl	Ciaravino et al., 2018
	4,7c	SORI	VanderWaal et al., 2017
	2,7 d		

a E = estado expuesto (oculto); b valor más probable (mínimo-máximo); c rebaños de leche; d otros tipos productivos.

Estimación de los parámetros de la transmisión de la tuberculosis en España

En España, también se han utilizado modelos de transmisión con el fin de estudiar la transmisión de TB en condiciones más específicas de nuestro país. Álvarez y colaboradores estimaron el coeficiente de transmisión intra-rebaño empleando datos de rebaños de la Comunidad de Madrid que incluían las principales aptitudes productivas en España (carne, leche y lidia) (Álvarez et al., 2012a). En este estudio demostraron la influencia del tipo productivo en la transmisión de la enfermedad, ya que el coeficiente de transmisión estimado en rebaños de leche ($\beta=4,3$) fue significativamente mayor que en rebaños de carne ($\beta=2,3$) y lidia ($\beta=2$), posiblemente debido al mayor contacto entre animales en condiciones más intensivas de producción, sugiriendo la importancia del tipo productivo en la recuperación de la calificación y, por tanto, la necesidad de incorporar dicha información en la construcción de los modelos de transmisión.

Ciaravino y colaboradores construyeron un modelo estocástico compartimentado para estimar los parámetros de transmisión de la TB dentro de los rebaños bovinos (Ciaravino et al., 2018). Posteriormente, dichos parámetros se emplearon para simular el número medio de casos secundarios causados por un solo animal infectado introducido en un rebaño, R_h (aproximación y misma interpretación del R_0), en función de diferentes frecuencias de los controles de rutina. Las explotaciones utilizadas para las simulaciones se seleccionaron a partir de datos de la campaña de erradicación en España (frecuencia y resultados de los saneamientos) y otras informaciones disponibles a nivel nacional (por ejemplo, censo y movimientos). Finalmente se emplearon 22 explotaciones bovinas con TB en las que la vía de infección más probable era la introducción de animales infectados. Dichas granjas fueron rebaños de carne en extensivo localizadas en zonas de alta prevalencia, principalmente centro y sur de España. Con este modelo se obtuvo una tasa media de transmisión de 5,2 nuevos animales infectados por individuo infeccioso al año y la duración media del periodo de latencia ($\lambda_1 + \lambda_2$) fue de 3,2 meses. Considerando una frecuencia para los controles de rutina de 6 meses, el valor medio de R_h fue 0,23, aumentando a 0,82 cuando se consideraron frecuencias anuales. Disminuyendo la frecuencia de los controles, los valores medios de R_h indicaron la posibilidad de un aumento de la transmisión, llegando a un valor medio de 3,5 para intervalos de 4 años entre dos pruebas.

Otras aplicaciones de los modelos para la investigación de tuberculosis

En un estudio con datos recogidos entre 1994 y 2000, Pérez y colaboradores estimaron la transmisión intra-rebaño para evaluar el número de casos derivados de la introducción de un animal infectado y la predicción de la diseminación/persistencia de la enfermedad en rebaños de leche en Argentina (Pérez et al., 2002). El modelo sugirió que la mejora de la Se de los tests diagnósticos podría facilitar el control de la enfermedad en ausencia de reservorios silvestres, pero tendría poco efecto en áreas donde estuvieran presentes. En Reino Unido, a través de un modelo estocástico que abordó la transmisión tanto dentro del rebaño como entre rebaños, Brooks y colaboradores demostraron que, además de la limitada Se de los tests diagnósticos, ciertos factores ambientales (tales como la presencia de reservorios silvestres o pastos contaminados) pueden ser esenciales en la persistencia de la infección local, pudiendo estar implicados en un 80% de los brotes, mientras que los movimientos de animales eran responsables de un 84% de los nuevos rebaños infectados (Brooks-Pollock et al., 2014). También en Reino Unido, los modelos desarrollados por Birch y colaboradores, apuntaron al importante papel de los movimientos de animales en la dispersión de la TB entre granjas y la importancia de reservorios silvestres en determinadas zonas para mantener la enfermedad en las mismas (Birch et al., 2018).

Otra de las aplicaciones de los modelos de simulación en los últimos años ha sido la evaluación del impacto que determinadas estrategias de control pueden tener en la reducción del número de animales infecciosos y en el diseño de programas de vigilancia. De esta manera, diversos estudios han evaluado las consecuencias de la aplicación de diferentes escenarios alternativos como la mejora de la vigilancia en matadero, la disminución/aumento en la frecuencia de aplicación de pruebas diagnósticas en función de la prevalencia de la enfermedad, el tamaño del rebaño o el tipo productivo (Conlan et al., 2012; Vanderwaal et al., 2017) y el efecto del incremento de la Se de la prueba de la tuberculina (Barlow et al., 1997). Gracias a la disponibilidad de los datos de movimientos de animales, Vanderwaal y colaboradores construyeron un modelo basado en redes de contacto integrando tanto la transmisión intra-rebaño como inter-rebaño para simular la dinámica de la TB animal en un país de baja prevalencia (Uruguay), y explorar así el impacto de la aplicación de medidas de vigilancia alternativas. Los resultados sugirieron que la eliminación de las pruebas en rebaños de bajo riesgo (<115 cabezas de ganado y ≤ 1 animal introducido en el rebaño en los tres años anteriores) produciría un descenso del 40% de los esfuerzos dedicados al control de la enfermedad sin derivar en un incremento de la incidencia de la TB animal en Uruguay. Sin embargo, las conclusiones pueden ser muy diferentes en función del área de estudio. Por ejemplo, las conclusiones obtenidas en el estudio de Uruguay fueron muy diferentes a las sugeridas por Brooks-Pollock y colaboradores en Reino Unido, un país con una alta prevalencia de TB bovina. En este estudio, pudieron comprobar que solo aquellas medidas de control orientadas al vacío sanitario de los rebaños, al incremento del número de saneamientos o a la aplicación de medidas profilácticas eran eficaces para controlar la diseminación de la TB animal (Brooks-Pollock et al., 2014). Es importante resaltar las diferencias epidemiológicas existentes entre ambos países, tales como la diferente prevalencia y la existencia de un reservorio silvestre de probada importancia en la epidemiología de la enfermedad en el caso de Gran Bretaña (el tejón) (Department for Environment, Food & Rural Affairs-DEFRA, 2019).

Diversos estudios han abordado también la problemática asociada a la fiabilidad de las pruebas diagnósticas (limitaciones en su Se y Sp), modelando su rendimiento y concluyendo que, cuando existe una presión infectiva externa (como puede ser el caso de España), las estrategias centradas en mejorar dicho rendimiento no son efectivas por sí solas (Kean et al., 1999; Conlan et al., 2012). En un estudio realizado en Nueva Zelanda, el incremento en la Se del test diagnóstico de un 80 a un 90% en áreas no endémicas y donde la infección era esporádica e infrecuente se tradujo en una reducción del tiempo medio que necesitaba un rebaño para recuperar la calificación, mientras que, si existía presión infecciosa local, los rebaños se re-infectaban una vez recuperada la

calificación (Barlow et al., 1997). Otra posible fuente de infecciones en rebaños de ganado es la presencia de animales no detectados (infección residual). En un estudio en Gran Bretaña, Conlan y colaboradores demostraron que la eliminación de la infección residual en rebaños infectados es insuficiente para prevenir por completo la recurrencia de la infección, por lo que la elevada tasa de infección externa (bien por movimientos de animales o fuentes medioambientales) debe tenerse en cuenta para reducir la persistencia de la enfermedad (Conlan et al., 2012).

El futuro de los modelos de transmisión en la investigación de la tuberculosis en España

Los avances tecnológicos, la disponibilidad de herramientas analíticas cada vez más potentes y el poder computacional de los ordenadores de hoy en día, permitirá desarrollar modelos que repliquen, de manera cada vez más precisa, el comportamiento real de la enfermedad en la población. Además de ello, la posibilidad de gestionar y procesar grandes cantidades de datos de manera rápida y simultánea, abre nuevas puertas al uso de estos instrumentos de análisis y podrá resultar de gran ayuda para abordar cada uno de los aspectos clave de la enfermedad: el control, la erradicación y la prevención.

Sin embargo, a día de hoy y a pesar de existir buenas estimaciones, en España la falta de datos precisos a nivel de censo y localización espacial de reservorios silvestres dificultan la cuantificación de su contribución en la transmisión de la enfermedad. Estudios adicionales que capturen la variabilidad de los parámetros de transmisión en España a través de modelos cada vez más complejos y realistas son necesarios para mejorar las estrategias de detección de los rebaños infectados y la eliminación de la enfermedad de los rebaños afectados. Un modelo ideal de transmisión intra-rebaño debería considerar el efecto que ciertos factores individuales como la edad, la raza, el tipo productivo y el manejo podrían jugar en la transmisión de la TB. Igualmente, el posible papel del medio ambiente como fuente de infección en la fauna silvestre e incluso en el ganado debería ser tenido en cuenta. A nivel de rebaño, la incorporación de la información que aportan los movimientos de ganado puede ayudar a reflejar de manera más realista la dinámica de la transmisión de la TB animal. La transmisión entre rebaños ha demostrado también estar asociada a la diseminación local, de tal manera que la probabilidad de transmisión desciende a medida que los rebaños se alejan en el espacio, lo que debe ser, por tanto, incorporado en el modelo.

La contribución de fuentes externas de infección a la transmisión intra- e inter-rebaño es compleja de parametrizar, pero en el contexto epidemiológico de

nuestro país resulta clave para cuantificar los fenómenos de transmisión en términos de persistencia y re-infección. La incorporación de la información que aporta la epidemiología molecular y la secuenciación masiva de cepas del MTBC a los modelos de transmisión puede también resultar clave para entender la evolución, la diversidad genética entre aislados de especies domésticas y silvestres y la distribución geográfica de la enfermedad.

4.1.3. Encuestas epidemiológicas

Giovanna Ciaravino, Marta Muñoz, Alberto Allepuz

Tipos de encuestas epidemiológicas y principales diferencias

Las encuestas consisten en una serie de preguntas diseñadas para recoger información estandarizada y son una herramienta muy usada en trabajos de investigación epidemiológica. A modo general, existen dos tipos de cuestionarios epidemiológicos en función del tipo de preguntas que se realicen:

Encuestas cerradas o estructuradas

Consisten en un listado de preguntas cerradas, es decir, preguntas que ya tienen todas las respuestas posibles, y en las que el entrevistado tiene que elegir una única de las opciones. Las encuestas no deberían de ser muy largas (aproximadamente 15-20 minutos) y podrían realizarse de diferentes maneras, ya sea mediante entrevista personal, por teléfono o a través del correo electrónico. Una vez elaborado el cuestionario, las respuestas se analizan y se cuantifican para conocer la distribución e interrelaciones entre ellas. Por lo tanto, el número de encuestas a llevar a cabo debe ser suficiente como para obtener una muestra que sea estadísticamente significativa y que permita extraer resultados respecto a la población estudiada. En este tipo de encuestas es muy importante que todas las personas que la realizan hagan las preguntas de la misma manera. En caso contrario, una misma pregunta puede ser interpretada de manera diferente por las personas encuestadas y obtener así datos muy sesgados; es decir, datos que no se corresponden con la información que queríamos obtener. Por ello, es vital que los encuestadores se reúnan previamente y armonicen criterios sobre lo que significan las diferentes preguntas. Además de ello, es importante tener en cuenta que es posible que mucha de la información que necesitamos ya esté disponible, por lo que no se deben hacer aquellas preguntas que se puedan responder en la oficina; ahorraremos tiempo y aumentaremos la probabilidad de obtener una

buena respuesta en aquellas que se han de conseguir en la entrevista. Una vez finalizada la encuesta, es necesario revisar las respuestas y comprobar que esté todo correcto. Es más sencillo completarlo al terminar, cuando todavía tenemos fresca la conversación, que más adelante. Es muy importante tener en cuenta que las conclusiones de la investigación epidemiológica son totalmente dependientes de la calidad de los datos recogidos. Los errores en la realización de la encuesta epidemiológica pueden inducir a conclusiones erróneas en el estudio epidemiológico.

Encuestas abiertas o semi-estructuradas

Consisten en una serie de preguntas en las que el entrevistado puede responder con sus propias palabras a las preguntas planteadas por el encuestador. Habitualmente, el encuestador tiene anotados los temas a tratar en lo que se conoce como "guion temático", y los plantea durante la conversación que mantiene con el entrevistado. Son entrevistas largas (aproximadamente 1 h) ya que lo que se pretende es profundizar en los diferentes temas planteados y lograr que surja información relevante para los objetivos de la investigación. Dado su carácter más profundo y personal, estas entrevistas suelen realizarse siempre cara a cara, con calma, en un contexto en el que tanto encuestador como encuestado se sientan cómodos y puedan entablar cierta confianza. De hecho, en ellas no se busca cuantificar las respuestas, sino tratar de comprender la realidad social a través de los argumentos expresados en las mismas. No es necesario realizar un número elevado de encuestas, pero sí que es importante que las personas a entrevistar representen a nuestra población de estudio. De esta manera, podremos recoger todos los argumentos que en ella circulan. También hay que tener en cuenta que son entrevistas que se deben grabar para su posterior análisis; en consecuencia, es necesaria la autorización para realizar dicha grabación y la firma de un compromiso de confidencialidad. Durante la entrevista se debe comenzar con unas preguntas que faciliten un clima comunicativo y tratar de seguir el guion temático establecido. En la medida de lo posible es preferible no tener este guion temático impreso y tratar de sacar los temas que se quieren abordar a medida que avanza la conversación. La presencia de otras personas en la entrevista, puede influir en las respuestas de la persona entrevistada por lo que es preferible que sea realizada por una sola persona, y a ser posible que siempre sea la misma, para limitar los sesgos asociados al encuestador. En la Tabla 3 y Figura 16 se muestran las principales diferencias entre los dos tipos de encuestas descritos anteriormente.

Tabla 3. Principales diferencias entre las encuestas cerradas y las abiertas.

Encuestas cerradas o estructuradas	Encuestas abiertas o semi-estructuradas
El entrevistado debe elegir una de las respuestas posibles	El entrevistado responde y argumenta con sus propias palabras a los temas planteados
Se puede realizar de manera presencial, por teléfono o correo electrónico	Debe ser siempre presencial
Duración 15-20 minutos	Duración de 50 minutos a una hora
Son útiles para cuantificar las respuestas e identificar relaciones	Son útiles para comprender la realidad social
Muestra estadísticamente significativa	Muestra estructuralmente representativa
Los datos se deben de incluir en una base de datos para su posterior análisis	Se deben de grabar para su posterior análisis
Tener en cuenta el sesgo derivado del encuestador	Tener en cuenta el sesgo derivado del encuestador

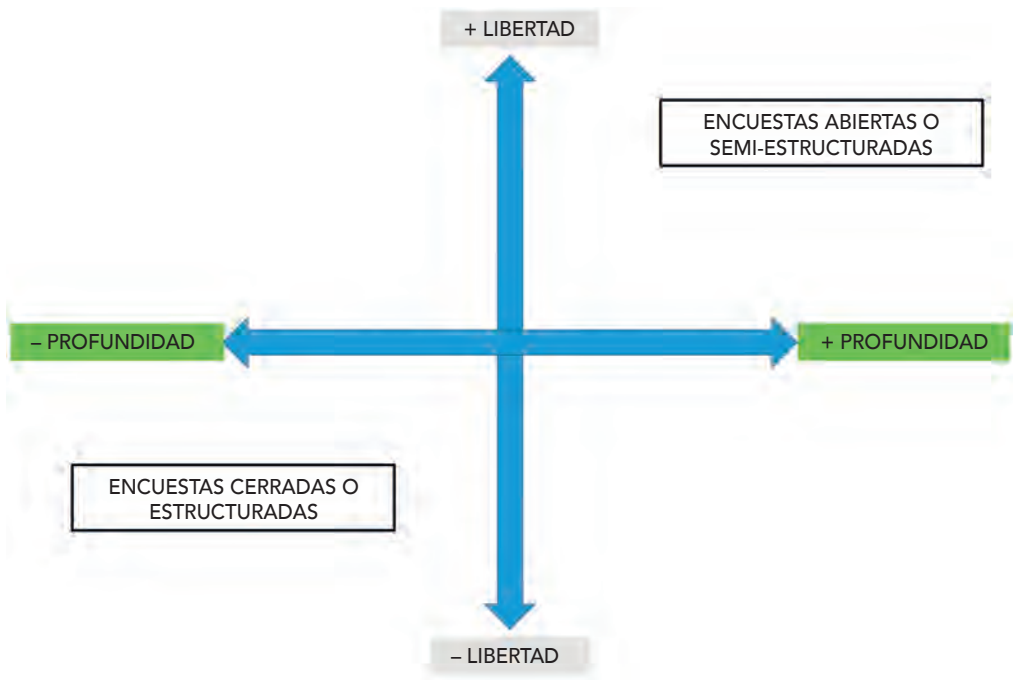


Figura 16. Grado de profundidad de la entrevista en base a la libertad con la que se realiza.

Pasos para la realización de una encuesta epidemiológica

La elección de un cuestionario cerrado o abierto dependerá principalmente del objetivo de nuestro estudio. Por ejemplo, si nuestro objetivo es valorar qué características son más frecuentes en las explotaciones con TB en relación a aquellas que son libres, lo más adecuado sería emplear una encuesta cerrada. Gracias a ella, podríamos obtener datos de muchas granjas que nos permitan investigar qué características son más frecuentes en cada grupo y tratar así de identificar factores de riesgo, es decir, aquellos que se observan con mayor frecuencia en las granjas con TB que en las sanas. Del mismo modo, si nuestro interés es determinar el origen más probable de un brote, el tipo de cuestionario más adecuado también sería un cuestionario cerrado donde podamos recoger información de interés para el estudio, por ejemplo, presencia de otros animales de producción en la granja, posibilidad de contacto directo o indirecto con animales de granjas vecinas, etc. En este caso particular, gran parte de la información necesaria para investigar el brote no sería necesario preguntarla en la granja, ya que se encuentra disponible en diferentes bases de datos (por ejemplo, datos de movimientos de animales, clasificación zootécnica, convivencia en la explotación con otras especies, censo animal, antecedentes a las pruebas de diagnóstico, etc.). Por el contrario, si nuestro objetivo es tratar de comprender por qué unas medidas de bioseguridad se aplican más que otras, o bien por qué algunas no se aplican en absoluto, el tipo de cuestionario más adecuado sería un cuestionario abierto. Este tipo de cuestionario podría ser útil para, a partir de los argumentos expresados por las personas entrevistadas y el análisis de los textos generados, comprender las principales motivaciones y barreras en relación a la aplicación de medidas de bioseguridad. También se ha de tener en cuenta que, para poder realizar un cuestionario con preguntas cerradas donde incluimos todas las posibles respuestas para cada una de ellas, debemos primero tener un buen conocimiento sobre cuáles son estas posibles respuestas. Dicha información puede obtenerse a partir de estudios anteriores descritos en la bibliografía, opinión de expertos en el sector, etc. Si no se dispone de dicha información sería preferible realizar primero un cuestionario con preguntas abiertas antes de emplear el cuestionario cerrado (por ejemplo, encuesta exploratoria).

Sea cual sea el tipo de cuestionario que se va a emplear, se ha de definir la información que queremos recoger (es decir, formular las preguntas de la encuesta) y a quién se le va a hacer la encuesta; es decir, debemos definir cuál será nuestra población objetivo. Una vez tengamos listo un primer borrador de cuestionario se deben realizar varias pruebas piloto a las personas a las que va dirigida la encuesta, para poder así detectar errores de formulación en las preguntas y poder realizar las modificaciones oportunas. El número de personas a incluir en el estudio (la muestra) dependerá del tipo de estudio que estemos realizando y del tipo de encuesta que empleemos (tal y como se ha mencionado en la anterior sección). En la Figura 17 se muestran los pasos a seguir en la elaboración de un cuestionario epidemiológico.

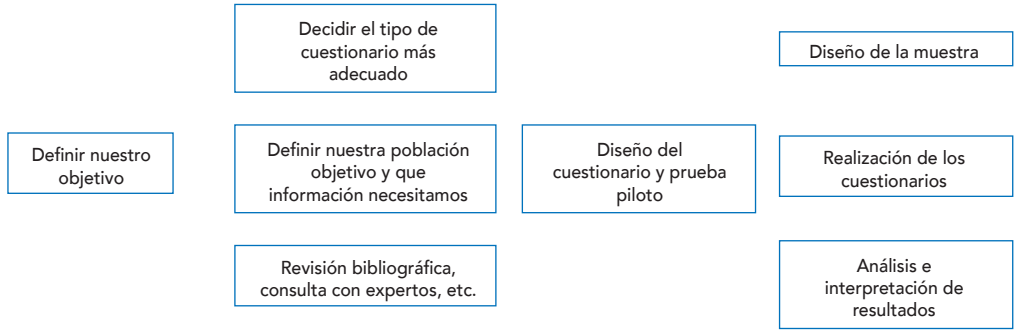


Figura 17. Pasos para la realización de un cuestionario epidemiológico.

Aplicaciones de encuestas epidemiológicas para la investigación de tuberculosis en bovinos en España

Según los objetivos de la investigación, las encuestas pueden ser utilizadas para:

- *Explorar* determinados argumentos o fenómenos cuando no hay suficiente información previa respecto al problema de la investigación, representando una primera “toma de contacto” con el objeto de estudio de la investigación; las encuestas suelen ser abiertas o semi-estructuradas;
- *Describir* la realidad; es decir, caracterizar los fenómenos estudiados y distinguirlos de otros; por lo tanto, documentan las actitudes o condiciones existentes en una determinada población en el momento en que se realiza el estudio; las encuestas empleadas pueden ser tanto cerradas como abiertas o semi-estructuradas;
- *Explicar* las posibles causas o factores de riesgo del problema investigado, tratando de determinar las relaciones de causa y efecto entre los fenómenos. Habitualmente se comparan dos o más grupos con características distintas (por ejemplo, enfermos y no-enfermos; expuestos y no-expuestos) y se utilizan encuestas cerradas.

Los principales estudios realizados en España en los últimos 5 años en los que se han utilizado encuestas para investigar la TB en bovino se han centrado en los siguientes aspectos:

Estudios sobre el origen más probable de la infección por tuberculosis en granjas de bovino

Con el objetivo de determinar las causas más probables de infección/re-infección, Guta y colaboradores (2014a) analizaron los datos de las encuestas

epidemiológicas llevadas a cabo en explotaciones de bovino positivas detectadas entre el 2009 y el 2011. Los datos recogidos a través de estas encuestas fueron almacenados en el sistema informático BRUTUB y el cuestionario epidemiológico empleado (encuesta cerrada) se puede encontrar en <https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia>. También se obtuvieron datos epidemiológicos adicionales de la base de datos nacional de micobacteriosis animales (Rodríguez-Campos et al., 2012) que gestiona VISAVET (Centro de vigilancia sanitaria veterinaria, Universidad Complutense de Madrid), y de otras bases de datos del Ministerio, principalmente del sistema integral de trazabilidad animal (SITRAN, 2019).

Para establecer la causa más probable de infección/reinfección en cada una de las granjas se consideraron 7 posibles vías de entrada:

- Resurgimiento: no se trata propiamente de una vía de entrada, sino de la reaparición de una infección residual presente en la granja, atribuible a diferentes factores como la presencia de animales anérgicos, persistencia del patógeno en el ambiente, falta de Se y/o incorrecta realización de las pruebas diagnósticas.
- Entrada de animales infectados: puede ser debido a la falta de Se de las pruebas pre-movimiento (o no haberlas realizado) o bien a movimientos no controlados.
- Pastos: contacto con otros animales infectados (ya sean bovino o caprino) en pastos de aprovechamiento en común.
- Caprino: interacción con cabras infectadas presentes en la zona que actúan como reservorio.
- Vecindad: granjas vecinas positivas.
- Fauna: interacción con ciervos, jabalíes o tejones infectados en los pastos o en las propias granjas.
- Personas: contacto con personas infectadas que pueden transmitir la bacteria a los animales.

La probabilidad asociada a cada una de las vías consideradas, se calculó mediante el método de árbol de decisión. Un árbol de decisión, por lo general, comienza con un único nodo y luego se ramifica en alternativas posibles. Cada una de esas alternativas crea nodos adicionales, que se ramifican en otras posibilidades; esto le da una forma similar a la de un árbol. Cada árbol contiene tres tipos diferentes de nodos: nodos de probabilidad, nodos de decisión (auto excluyentes) y nodos terminales (o resultados) (Figura 18).

En las granjas en las que se consiguió identificar una (o dos) causas probables, las vías de entrada más frecuentes fueron la infección residual (22,3%; 95% CI: 19,4–25,6) y las interacciones con reservorios silvestres (13,1%; 95% CI:

10,8–15,8), seguidas de la vecindad (8%; 95% CI: 6,2–10,3) y el movimiento a pastos (7,1%; 95% CI: 5,4–9,2). Sin embargo, cabe destacar que, en un elevado número de granjas investigadas (aproximativamente 40%), la infección resultó asociada a una causa desconocida, principalmente debido a la falta de datos. La vía de infección se dio por desconocida también cuando la infección resultó asociada a más de dos causas posibles.

Utilizando la misma metodología desarrollada por Guta y colaboradores (2014a) y las mismas fuentes de datos (BRUTUB), se volvió a analizar la causa más probable de infección para las nuevas granjas positivas reportadas entre 2014 y 2016 (Ciaravino et al., 2020). En este periodo, se grabaron en el sistema informático BRUTUB un total de 3.821 encuestas. El grado de cobertura en el territorio fue variable; a pesar de ello, se obtuvieron datos de granjas localizadas en diferentes puntos de España.

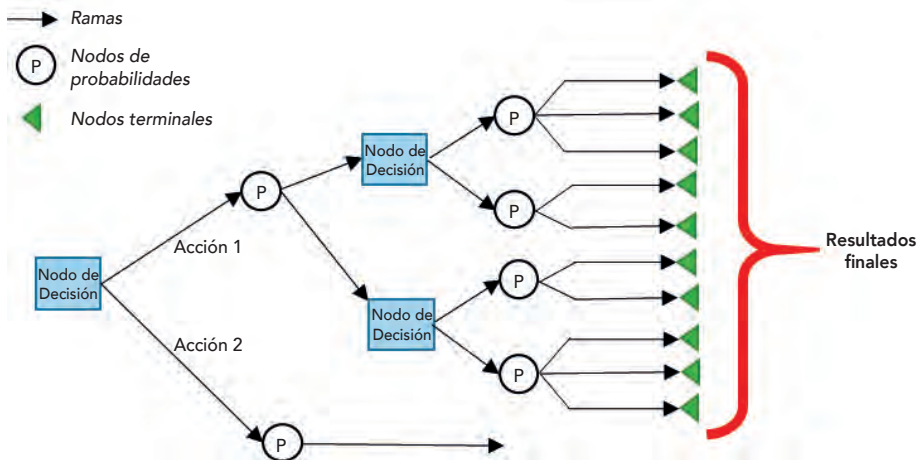


Figura 18. Estructura general y esquematizada de un modelo de árbol de decisión.

Para cada posible vía, se desarrolló un árbol de decisión específico, incluyendo preguntas clave en función de la vía considerada. Las respuestas a estas preguntas clave conducen a diferentes eventos dentro de cada árbol de decisión. Un sistema de valoración cualitativa de los distintos eventos (por ejemplo, probabilidades asignadas en una reunión de expertos) permitió determinar la vía de infección más probable. Las encuestas analizadas en este estudio fueron 687 (el 22% de todas las granjas detectadas positivas entre 2009 y 2011) con una cobertura variable en función de la Comunidad Autónoma.

A la mitad de las granjas analizadas (53%) se les asignó una única causa de entrada, al 34% se les asignaron dos posibles causas y para el 6% de las granjas, se consideró que había tres posibles causas.

El resurgimiento de una infección previa residual y la interacción con fauna silvestre infectada fueron las causas más frecuentes (36% en ambos casos), seguidas de la entrada de animales (14%) (Tabla 4). Los pastos compartidos y la interacción con granjas vecinas infectadas presentaron valores más bajos (6% y 3%, respectivamente). La interacción con caprino infectado no se identificó como la causa más probable en ninguna de las explotaciones analizadas, quizá por falta de información, ya que no se citó la presencia de cabras en ninguna granja. Respecto a los posibles casos de TB por transmisión desde humanos, los siete casos que reportaron historial en personas, tuvieron causas más evidentes de transmisión, excepto una en la que la causa pudo ser tanto una infección residual como la transmisión a partir de una persona afectada.

Las explotaciones donde se consideró la vía de entrada como “desconocida” se redujo en relación al trabajo anterior; 6% frente al 42% de Guta et al. (2014a) (Tabla 4). Este resultado es debido, por un lado, a que se modificó ligeramente el sistema de atribución de causas respecto al estudio anterior (la vía de infección se dio por desconocida en los casos en los que había más de tres causas posibles en lugar que dos); por otro lado, indica una mejora en la realización de las investigaciones epidemiológicas y de la información disponible, evidenciando la importancia de la calidad de los datos recogidos.

Tabla 4. Vía más probable de entrada de la tuberculosis en las granjas, 2014-2016.

Vía	Frecuencia	Porcentaje	Datos de Guta et al (2014a) (n=687)
Entradas	526,3	14%	5%
Fauna	1359,3	36%	13%
Pastos	222,6	6%	7%
Residual	1373,5	36%	22%
Vecinos	115,8	3%	8%
Otras	0,5 (humanos)	0,01%	0,3%
Cabras	0	0%	2,5%
Desconocido	221	6%	42%
Total	3.818		

Los decimales son debidos a que cuando hay dos o tres causas posibles, se han contabilizado 0,5 y 0,3, respectivamente.

Estudios sobre los factores de riesgo de la tuberculosis en bovinos

En los últimos cinco años, diferentes grupos han realizado estudios de factores de riesgo empleando encuestas cerradas. A continuación, se describen los hallazgos y principales resultados de los mismos.

Entre las actuaciones que forman parte del Programa nacional de erradicación de la TB bovina, se prevé la realización de encuestas epidemiológicas en todos los nuevos rebaños positivos, con el fin de identificar factores de riesgo para la infección de TB. Para esto, las mismas encuestas se realizan también en explotaciones libres de TB (controles) relacionadas con las explotaciones positivas (casos). En particular, las explotaciones "control" tienen que estar ubicadas en la misma zona de las explotaciones "caso" y tener censo, aptitud productiva y manejo similares.

A partir del 2012, dichas encuestas han sido grabadas en el sistema informático BRUTUB. El cuestionario epidemiológico utilizado, disponible *online* (<https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia>), incluye preguntas sobre el sistema de producción (es decir, intensivo versus extensivo); manejo (movimientos de entrada de ganado a la granja, prácticas de reemplazo, etc.); presencia en la granja de otras especies domésticas (ovejas, cabras o carnívoros domésticos); prácticas (por ejemplo, presencia de drenaje desde o hacia otras propiedades, uso de áreas de pastoreo comunes, etc.); características de las granjas vecinas (por ejemplo, presencia de áreas adyacentes de caza u otras granjas, rebaños de vacas vecinos, etc.); datos de salud de los animales (por ejemplo, evidencias de paratuberculosis (PTB), antecedentes de TB, etc.) e historial de casos en personas.

Utilizando las encuestas disponibles en el sistema BRUTUB, Ciaravino et al., (2020) analizaron los datos de 196 granjas con TB (casos) detectadas entre los años 2014 y 2018 y 160 granjas que, en la misma ventana temporal, estuvieron libres de TB por 2 años consecutivos (controles). Las explotaciones investigadas resultaron ser mayoritariamente rebaños de carne (90%) con un manejo extensivo.

Los resultados principales identificaron los siguientes factores de riesgo:

- Las granjas que fueron a pasto, tuvieron un riesgo entre 1,5 y 4,2 veces superior de infectarse que las que no fueron.
- Un mayor número de movimientos se asoció a un mayor riesgo de infectarse.
- La presencia de granjas vecinas en un radio de 1 km aumentó el riesgo entre 1,02 y 3,3 veces, pero solo si había cérvidos o jabalíes en la zona.
- La presencia de cérvidos y jabalíes fue un factor de riesgo solo en granjas en extensivo y si había otras granjas de bovino en la vecindad (incremento del riesgo entre 1,03 y 4,9 veces).

Unos años antes, Guta et al. (2014b) compararon los datos recogidos, entre el 2002 y el 2011, a través de una encuesta cerrada, en 70 granjas que habían tardado más de 5 años consecutivos en eliminar la TB (casos) con los datos de 80 granjas en las que se había conseguido eliminar la TB del rebaño en 1 o 2 años (controles). El estudio se centró en granjas de Andalucía y Castilla-La Mancha, y como principales factores de riesgo para la persistencia de la TB en estas granjas encontró que las que contaban con grandes áreas de pasto y presencia de granjas vecinas infectadas con TB tuvieron más dificultades para erradicar la enfermedad y, por lo tanto, tenían una mayor probabilidad de sufrir una infección persistente. En particular, las granjas con grandes áreas de pasto tenían una probabilidad entre 1,2 y 12,7 veces mayor de tener infecciones persistentes que las granjas con pequeñas áreas de pasto. En los rebaños que tenían un vecino infectado el riesgo de persistencia aumentó entre 1,2 y 5,1 veces.

En los mismos años, Cowie y colaboradores (2014a) llevaron a cabo un estudio para identificar los posibles factores de riesgo de presencia de TB en el ganado bovino en el municipio de Almodóvar del Campo (provincia de Ciudad Real). Para esto, se compararon los datos recogidos en 27 granjas detectadas positivas a TB al menos una vez entre 2006 y 2009 (casos), y 46 granjas que habían estado libres de TB durante el mismo periodo (controles). Las preguntas utilizadas se desarrollaron a partir de una revisión de la literatura y el cuestionario (encuesta cerrada) está disponible *online* (https://static-content.springer.com/esm/art%3A10.1007%2Fs10344-013-0757-0/MediaObjects/10344_2013_757_MOESM2_ESM.pdf). Los factores de riesgo que resultaron más robustamente asociados con la presencia de TB en una granja fueron la presencia de reservorios silvestres (por ejemplo, cérvidos, jabalí, y tejones), el número de arroyos por hectárea y el volumen de alimentos (por ejemplo, heno) presente en el suelo. En su conjunto, estos resultados indican que mantener hospedadores de TB, como ciervos y jabalíes, en altas densidades para fines de caza (por ejemplo, granjas cinegéticas), puede representar un obstáculo para alcanzar un control efectivo de la TB. Por otra parte, también se indica que limitar la agregación de reservorios silvestres y ganado bovino alrededor de las fuentes agua y alimentos podría reducir el riesgo de transmisión entre estos grupos.

Otro estudio, que también utilizó un enfoque de caso-control y una encuesta cerrada para investigar los factores de riesgo para TB en las explotaciones de bovino, se llevó a cabo entre el 2010 y el 2012 en las Comunidades Autónomas de Cantabria y Asturias (Cowie et al., 2014b). El cuestionario empleado incluyó preguntas sobre las características de las granjas, las prácticas de manejo y otros factores externos que podrían afectar al ganado, incluida la presencia de reservorios silvestres. El estudio también tuvo en cuenta el manejo estacional de los rebaños que caracteriza ambas áreas. En este caso, se entrevistaron un total de 100 ganaderos, de los que 35 habían tenido algún

animal positivo a TB en los 5 años anteriores a la fecha de la entrevista (es decir, granjas casos). En particular, en Asturias se compararon 24 granjas caso y 13 granjas control y en Cantabria, 11 granjas caso y 52 granjas control. Los resultados principales evidenciaron que en presencia de jabalíes y/o tejones (en temporada de invierno) la probabilidad de contraer TB para las explotaciones bovinas aumentaba entre 6,2% y 9,4%; el uso de establos donde el movimiento del ganado no estaba restringido también incrementó la probabilidad de contraer TB entre el 3,8% y 6,7%, así como el contacto con otros rebaños de bovino en el pasto (en temporada de verano) que aumentó la probabilidad de infección entre 1,2% y 2,5%.

En la Tabla 5 se presentan los factores de riesgo para la TB en bovinos más consistentemente identificados en distintos estudios publicados. En dicha Tabla se han incluido tanto estudios realizados en España como en otros países.

Tabla 5. Principales factores de riesgo para la tuberculosis bovina.

Fuente: adaptado de Skuce et al. (2012) y Broughan et al. (2016).

Estudios sobre las opiniones con respecto al control de la tuberculosis en bovino

En determinados contextos, las estrategias de prevención y control pueden no alcanzar los resultados esperados. Los principales factores que dificultan la erradicación de la TB pueden clasificarse en dos tipos:

- Componentes biológicos: vinculados al patógeno, al huésped y al medioambiente (por ejemplo, dinámicas de infección, factores de riesgo, causas de infección y persistencia, herramientas de control, etc.).
- Componentes sociales (no-biológicos): son factores sociológicos, económicos, culturales, étnicos/raciales, psicológicos y de comportamiento, que afectan a los componentes biológicos.

Por lo tanto, la comprensión de los aspectos que dificultan la erradicación requiere tener en cuenta también los componentes no-biológicos, ya que éstos influyen tanto en la infección, como en la detección y control de la TB (Pfeiffer, 2013). Las entrevistas (encuestas abiertas, semiestructuradas o cerradas) son las técnicas de investigación más frecuentemente utilizadas para recoger información sobre opiniones y percepciones de las personas.

En el periodo 2015-2017, se realizó una investigación multidisciplinar (ciencias sociales y ciencias de la salud) en tres fases, para profundizar en el conocimiento sobre los aspectos sociológicos relacionados con la erradicación de la TB en bovinos en España (Figura 19). La investigación se llevó a cabo en las Comunidades Autónomas de Andalucía (zona de alta prevalencia) y Cataluña (zona de baja prevalencia), incluyendo ganaderos de carne, leche y lidia, así como veterinarios de saneamiento y veterinarios oficiales.

Las primeras dos fases permitieron conocer cuáles son las percepciones, opiniones y creencias de ganaderos y veterinarios sobre el Programa de erradicación de la TB en bovinos (Ciaravino et al., 2017).



Figura 19. Esquema de la estructura de la investigación multidisciplinar sobre los aspectos sociológicos relacionados con la erradicación de la tuberculosis en bovinos.

Inicialmente (primera etapa) se realizaron entrevistas exploratorias (encuesta abierta) cara a cara a 13 personas clave del programa, con el fin de identificar los principales argumentos circulantes. Cada entrevista exploratoria fue guiada por

6 temas abiertos de conversación (puntos fuertes y débiles del Programa, causas por las que no se ha erradicado la TB, perspectivas futuras, cambios necesarios y beneficios de estar libre). Posteriormente (segunda fase), en base a los resultados de las encuestas exploratorias, se desarrolló un guion temático (encuesta semi-estructurada, Figuras 19 y 20) para entrevistar a una muestra de 25 ganaderos y 14 veterinarios, con el fin de conocer sus percepciones, opiniones y creencias sobre el Programa de erradicación de la TB bovina.

Confianza en los resultados y en la ejecución de los test diagnósticos en vivo	Relaciones personales entre servicios veterinarios oficiales, veterinarios de saneamiento y ganaderos
Información y comunicación	Real Decreto en Lidia
Formación de veterinarios y ganaderos	Costes debidos al saneamiento y a la aplicación de las medidas de control
Fauna silvestre y otros reservorios domésticos	Importancia percibida de la tuberculosis en bovinos
Tipología, características y manejo de la granja	Sugerencias y mejoras para el Programa de erradicación de la tuberculosis en bovinos

Figura 20. Guion temático de las entrevistas en profundidad (encuestas semi-estructuradas, individuales, cara a cara).

Los argumentos principales que surgieron en estas entrevistas evidenciaron que el Programa de erradicación se percibe como una imposición normativa sin una adecuada motivación para su aplicación, especialmente entre los ganaderos, ya que estos perciben pocos o nulos beneficios en la erradicación de la enfermedad. En relación a la detección de la TB, los temas principales estaban relacionados con la falta de confianza en las pruebas diagnósticas *in vivo* y con la validez de sus resultados. Los ganaderos de carne y de leche también reportaron sentirse discriminados en comparación a granjas de lidia y granjas cinegéticas, por las diferencias en la aplicación del Programa de erradicación. Los resultados de este estudio también mostraron la existencia de un sentimiento general de desconfianza hacia los servicios veterinarios oficiales y la importancia de mejorar las estrategias de comunicación para mejorar la confianza entre las diferentes partes que participan en el plan de erradicación. Dicha confianza se ve perjudicada, principalmente, por la falta de comprensión de los resultados de las pruebas y medidas de control, y la falta de percepción de los riesgos sanitarios asociados a la TB, así como por lagunas en el conocimiento de la enfermedad. Además, las entrevistas resaltaron que los veterinarios privados tienen un papel importante en la influencia de la opinión de los ganaderos, por lo que su sentimiento de apoyo inadecuado por parte de los servicios veterinarios debe tomarse en cuenta.

En la tercera etapa de la investigación se realizó una encuesta telefónica a una muestra aleatoria de 180 veterinarios y 706 ganaderos. A partir de los resultados de las entrevistas abiertas en profundidad, Ciaravino y colaboradores (2020) diseñaron un cuestionario cerrado para cuantificar cuántas personas, entre ganaderos y veterinarios, compartían los mismos argumentos y, así, caracterizar los perfiles de opiniones existentes con respecto al Programa de erradicación de TB en bovinos.

Los resultados principales de este estudio evidenciaron que la actitud de las personas entrevistadas hacia el Programa y su aplicación está influenciada principalmente por la percepción sobre el impacto de la TB, la confianza en los resultados de las pruebas de diagnóstico y las opiniones sobre la importancia de otros reservorios. Los veterinarios expresaron en su mayoría una actitud positiva hacia el programa, mientras que los ganaderos mostraron una elevada heterogeneidad en sus opiniones y presencia de actitudes opuestas. En particular, se identificaron tres perfiles distintos de opinión o actitudes hacia el Programa de erradicación (Figura 21):

- Personas con una **actitud positiva** (círculo en verde): este grupo se definió principalmente por considerar fiables los resultados de las pruebas diagnósticas en vivo (prueba en piel y en sangre), por ser conscientes del riesgo zoonótico de la TB y por no estar de acuerdo con que la TB es una excusa para reducir la cabaña ganadera del sur de Europa. También estas personas suelen atribuir un papel secundario a los reservorios silvestres. Las personas con esta actitud fueron sobre todo los veterinarios (oficiales y de saneamiento) y alrededor de un tercio de los ganaderos entrevistados, tanto de leche como de carne (especialmente de zonas de baja prevalencia).
- Personas con una **actitud negativa** (círculo en rojo): este grupo se caracterizó por pensar que la TB es una excusa para reducir la cabaña ganadera del sur de Europa y por desconfiar de los resultados de los test diagnósticos, sobre todo de la prueba en piel. Estas personas también perciben que son los ganaderos los que asumen la mayoría de los costes debidos a la detección y control de la enfermedad. Además, la gran mayoría de ellos no cree en la existencia de medidas de bioseguridad efectivas para prevenir la transmisión de TB entre bovinos y reservorios silvestres, a los que atribuyen un papel principal en el mantenimiento de la misma. Las personas con esta actitud fueron principalmente ganaderos de zonas con alta prevalencia. Sin embargo, vale la pena señalar que, entre los entrevistados, también algunos veterinarios oficiales y varios veterinarios de saneamiento mostraron esta misma actitud.
- Personas con **tendencia a no contestar** (círculo en azul): este grupo se compone de las personas que no respondieron a muchas de las preguntas planteadas. Estas personas eran casi exclusivamente ganaderos (carne y leche) de zonas de alta y baja prevalencia.

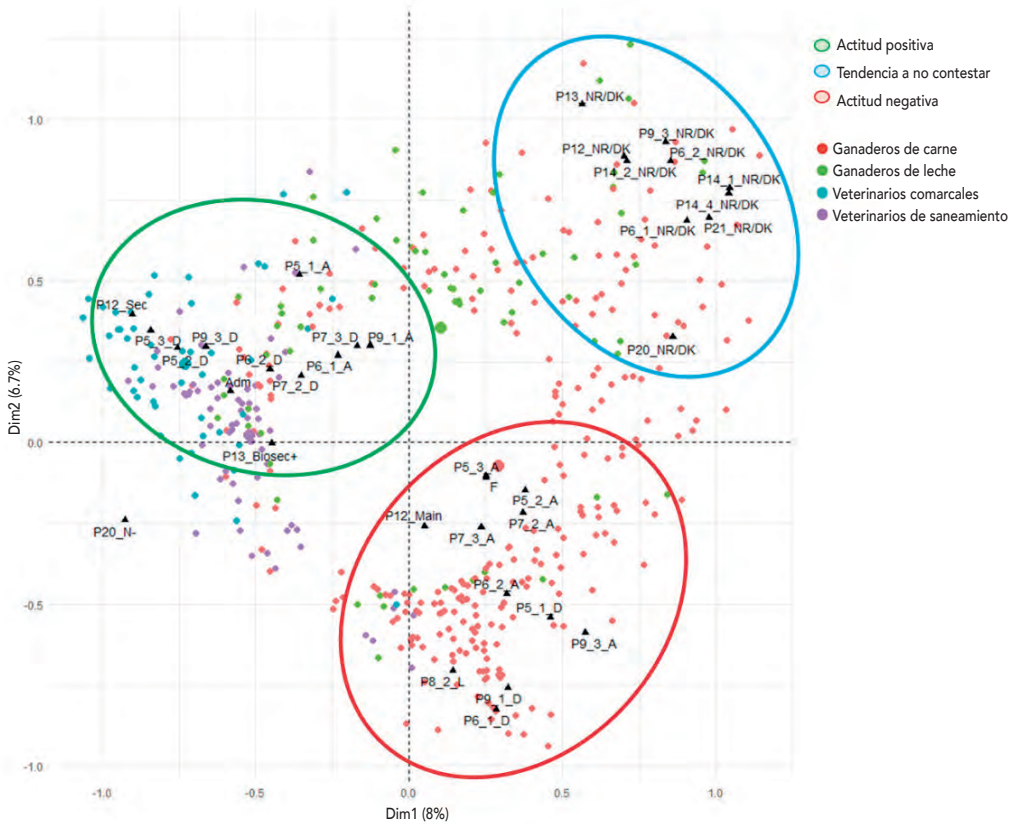


Figura 21. Mapa de distribución de las categorías de respuestas y de las personas entrevistadas. En este gráfico (biplot), los triángulos en negro representan las respuestas a las distintas preguntas (categorías de las variables). Los puntos representan las personas entrevistadas y cada tipología se representa con un color distinto. Cuanto más cerca se disponen los individuos (es decir, los puntos), más parecido será el perfil de las respuestas que han dado. Por lo tanto, podemos ver que los veterinarios son más compactos que los ganaderos, especialmente los veterinarios comarcales, y que la forma en la que se distribuyen los ganaderos indica la presencia de opiniones opuestas.

En otro estudio realizado en Ciudad Real en 2013, Cowie et al. (2016) investigaron las opiniones de ganaderos (producción de ganado bovino), cazadores de caza mayor y veterinarios directamente implicados en la aplicación del Programa de erradicación de la TB, respecto a las posibles intervenciones en el manejo para reducir los niveles de TB en el ganado bovino. El estudio se llevó a cabo en dos fases: primero un panel de expertos clasificó dichas intervenciones en base a la efectividad de las mismas y en segundo lugar, se realizó una encuesta

(cuestionario cerrado) a una muestra de 36 ganaderos, 32 cazadores y 34 veterinarios, con el fin de clasificar las primeras 20 intervenciones más efectivas en función de su practicidad y viabilidad. Las cuatro principales intervenciones evaluadas como más efectivas fueron: (i) detener la alimentación suplementaria de animales silvestres en las granjas de ganado; (ii) separar el acceso a los pozos de agua de animales silvestres y ganado bovino; (iii) aumentar la frecuencia de los controles de rutina para la TB en los bovinos; y (iv) eliminar las vísceras después de la caza mayor. Teniendo en cuenta ambas clasificaciones (efectividad y practicidad), las tres "mejores" intervenciones resultaron ser: (i) separar el acceso a los pozos de agua de animales silvestres y ganado bovino; (ii) efectuar controles trimestrales (prueba en piel) en granjas con un caso reciente de TB y (iii) eliminar las vísceras después de la caza mayor.

4.2. Diagnóstico

4.2.1. Pruebas de intradermorreacción (IDTB)

Lucía de Juan, Álvaro Roy, Alberto Díez, Lucas Domínguez, Javier Bezos

Revisión histórica de la prueba

La prueba de IDTB es la técnica oficial por antonomasia empleada para el diagnóstico de la TB bovina (de la Rua-Domenech et al., 2006; Bezos et al., 2014), empleándose también en otras especies de rumiantes domésticos como el ganado ovino y caprino, e incluso en fauna silvestre (Fernández-de-Mera et al., 2011; Busch et al., 2017). El empleo sistemático de la IDTB en el contexto de los programas de erradicación de TB bovina, los cuales incluyen el uso estratégico de pruebas de diagnóstico complementarias, así como otras medidas adicionales en el ámbito del manejo y la bioseguridad, ha permitido alcanzar el estatus de oficialmente indemne de TB bovina en diversos países (EFSA y ECDC, 2018).

Para situar el origen de la prueba de IDTB hay que remontarse a la Alemania de 1890, cuando el microbiólogo Robert Koch, descubridor del bacilo causante de la TB, estaba investigando en la búsqueda de un reactivo que sirviese para tratar o prevenir la enfermedad. Para ello, cultivó la bacteria en un medio con glicerol para, posteriormente, secarlo por evaporación y filtrarlo. Este filtrado recibió el nombre de Tuberculina Vieja de Koch (*Koch's old tuberculin-KOT*) y contenía la fracción soluble del bacilo tuberculoso en una solución con un 50% de glicerol. Koch, enfermo de TB, se inyectó KOT para demostrar sus propiedades terapéuticas. La inoculación le causó una fiebre intensa que también fue observada en otros pacientes a los que se les había

administrado KOT de forma subcutánea. Koch no dio importancia inicialmente a este hallazgo, pero algunos veterinarios de la época de países como Rusia, Estados Unidos, Gran Bretaña o Dinamarca sugirieron el potencial diagnóstico que podría tener en ganado bovino la detección de esta hipertermia asociada a la inoculación subcutánea de KOT. Una vez descartado el efecto terapéutico, los estudios se fueron centrando en el desarrollo de la prueba diagnóstica. En 1891, McFadyean realizó estudios en ganado bovino, inyectando diferentes cantidades de tuberculina en el pecho de animales con TB clínica y midiendo su pulso y temperatura cada 2 h. McFadyean observó un incremento gradual de la temperatura durante las primeras 14 h tras la inyección, alcanzándose un pico que se mantenía durante 4 h para ir luego disminuyendo hasta normalizarse a las 48 h. Conjuntamente a la hipertermia, describió una inflamación en el lugar de inoculación, un aumento del tamaño de los nódulos linfáticos regionales y un incremento del pulso, hallazgos que con el paso del tiempo podemos comprobar que fueron de gran relevancia y dieron origen a la actual interpretación de la prueba de IDTB. McFadyean, de hecho, ya sugirió en sus estudios la existencia de animales anérgicos, pues informó de la presencia de vacas con lesiones tuberculosas diseminadas que no habían sido positivas a la prueba, pese a haberse aplicado un protocolo similar al resto de animales que sí habían reaccionado (Good et al., 2018).

Otro veterinario ilustre asociado al desarrollo de la prueba de IDTB fue el danés Bernard Bang, el cual introdujo la prueba de la tuberculina empleando KOT como la herramienta diagnóstica de elección en el primer programa de erradicación de TB bovina que se instauró en Dinamarca a comienzos de 1890. El denominado "método de Bang" consistió en la repetición de la prueba de la tuberculina cada 6 meses, lo que permitió la separación de los reactores positivos para su posterior sacrificio, especialmente de aquellos con lesiones tuberculosas en la ubre, limitando así la vía principal de transmisión a los humanos, pues ya se había descrito por entonces la presencia de la bacteria en la leche de los animales enfermos. A comienzos de 1900 ya se pudieron certificar, empleando este sistema, varias explotaciones de leche como negativas durante varios años; su leche era vendida con garantía de mayor seguridad. El "método de Bang" fue internacionalmente aceptado como la principal herramienta diagnóstica para el control de la TB y, de hecho, en la actualidad, el empleo sistemático de la prueba IDTB continúa siendo la base de los programas de erradicación de la TB bovina. En Estados Unidos también se realizaron estudios de gran interés que contribuyeron al desarrollo de la prueba de IDTB tal y como se aplica actualmente. Las primeras pruebas en ganado bovino consistieron en la aplicación subcutánea de la tuberculina en la región escapular y la monitorización de la temperatura durante varios días antes y después. A pesar de las variaciones observadas en la temperatura de forma natural, que

dificultaban mucho la interpretación de la prueba, esta metodología consiguió disminuir la prevalencia de TB bovina en el distrito de Columbia del 18,9% al 0,8% en apenas una década (1909-1918). A pesar de este éxito, hubo detractores del proceso de erradicación pues algunos sectores argumentaron que era innecesario una detección precoz de la infección y, que lo más importante, era detectar animales en fases avanzadas de la enfermedad que, sospechaban, eran los más excretores. Incluso ya había entonces opiniones que sugerían que el programa era demasiado estricto para tratarse de una enfermedad crónica e incluso que debía ser sufragado por los ganaderos y no por el gobierno. Todas estas críticas, las cuáles circulan también en nuestros días, pretendían poner en entredicho la fiabilidad de la prueba de IDTB. A pesar de que es conocido que la prueba no es perfecta en términos de Se y Sp, estudios previos ya pusieron en evidencia la profesionalidad de ciertos veterinarios y ganaderos, los cuáles mediante prácticas no permitidas contribuyeron a alterar la percepción que se tenía sobre la utilidad de la prueba de IDTB (Good et al., 2018).

En 1908, el médico francés Charles Mantoux describió que la inoculación intradérmica de tuberculina era una metodología efectiva para el diagnóstico de la TB en humanos. Paralelamente, Foth describía que la aplicación del test oftálmico permitía detectar animales que no reaccionaban a la aplicación subcutánea en cuello. A partir de estos hallazgos, se iniciaron diversos estudios que acabaron concluyendo que el mejor rendimiento de la prueba era cuando la tuberculina era inyectada de forma intradérmica, pues sugerían una mejor asimilación del reactivo. Joséph hizo grandes aportaciones al desarrollo y conocimiento de la prueba de IDTB: (1) indicó que no había relación entre la respuesta cuantitativa y el grado de lesión observado en los animales, (2) que la respuesta podía variar dependiendo de la concentración de antígeno presente en la tuberculina, (3) que la tuberculina debía inocularse de forma intradérmica en las tablas del cuello para mejorar el rendimiento y evitar la necesidad de registrar periódicamente la temperatura, y (4) que no había correlación entre reacción positiva y excreción en leche (Good et al., 2018).

En 1909, Römer describió una metodología de interpretación que incluía los criterios para considerar la reacción como positiva, dudosa o negativa. Por aquel entonces también se sugería el pliegue de la cola como una región apta para la inoculación de la tuberculina, aunque los estudios de Christiansen (1910) indicaron que el cuello era mejor opción con base en estudios sobre las características físicas del tejido y la naturaleza y tipo de reacción desencadenada. A pesar de ello, la prueba caudal fue ampliamente empleada en Estados Unidos, donde se convirtió en la prueba oficial de diagnóstico (1921) debido, entre otras causas, a su mayor practicidad en animales de manejo difícil, en los que la necesidad de acceder al cuello suponía un mayor riesgo para el veterinario. A partir de 1930 se emprendieron estudios más completos con objeto de dilucidar si el resultado

de la prueba variaba significativamente dependiendo de la región donde se inoculase la tuberculina. Estos estudios estaban asociados a otros que describían la presencia de reacciones positivas en personas y animales sanos, lo que sugería la existencia de interferencias diagnósticas relacionadas con la composición de la tuberculina y la infección por otras bacterias no tuberculosas relacionadas (Good et al., 2018).

Fue a partir de 1940, con los estudios principalmente de Buxton y Glover (1942), Francis (1947), Larsen (1950, 1960) y Paterson (1959), cuando se definió la región actualmente recomendada para la inoculación de la tuberculina bovina (y aviar en el caso de aplicar IDTB comparada) y el tiempo de lectura óptimo para la interpretación de la prueba, argumentándose que así se alcanzaba una mejor discriminación entre animales infectados y sanos. Francis definió el tiempo óptimo de lectura de la prueba tras numerosos estudios, estableciéndolo en 72 h (con un margen de 4 h). Los estudios de Larsen confirmaron que las tablas del cuello era la región óptima para maximizar la Se de la prueba, lo que ya habían sugerido los estudios previos de Joséph, Christiansen, Stub y Foth, entre otros (Good et al., 2018), y que décadas después se ha vuelto a demostrar, esta vez empleando un número mayor de animales y bajo diferentes condiciones epidemiológicas (Casal et al., 2015).

Metodologías actuales, protocolo de realización y factores críticos que pueden afectar a su rendimiento

La prueba de IDTB también es conocida en España como “prueba de la tuberculina” desde el inicio de las campañas de erradicación a principios de los años 50. La metodología de realización y lectura, aparentemente sencilla, requiere de personal entrenado y con experiencia, razón por la cual actualmente se contemplan cursos de formación de asistencia obligatoria para los profesionales involucrados en las campañas de saneamiento. El origen de estos cursos de formación se remonta al año 2012 cuando, por aquel entonces, el Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (MAPAMA) los implementó a sugerencia del Subgrupo de TB bovina de la *Task Force* dependiente de la Comisión Europea. Además, incluyó nuevas medidas dentro del Programa nacional de erradicación, recogiendo que todos los profesionales veterinarios que intervienen en la ejecución de las pruebas de campo deben haber superado cursos de formación reglada en los aspectos teóricos, prácticos y de base legal en cuanto al diagnóstico de la TB bovina. De hecho, el incremento en la prevalencia de la TB bovina que se produjo en España a partir del periodo 2014-2016 se achacó, por parte de los gestores del programa de erradicación, a una mejora en el diagnóstico en campo y no a una mayor transmisión de la enfermedad.

Actualmente se aplican dos variantes de la técnica, la IDTB simple (IDTBs) y la comparada o de comparación (IDTBc). Ambas se basan en la producción local de una reacción de hipersensibilidad retardada o de tipo IV (*delayed type hypersensitivity*, DTH) en los animales infectados frente a un antígeno específico (Kasempimolporn et al., 2019). La DTH es una reacción inflamatoria de base celular inducida por citoquinas secretadas por ciertas subpoblaciones de linfocitos Th1 previamente activados por el contacto anterior con un antígeno, caracterizada por el reclutamiento al foco infeccioso de multitud de células inflamatorias, células de Langerhans, linfocitos T y basófilos, produciendo así una reacción inflamatoria local (Palmer, 2007). En el caso de la IDTB, si el animal que recibe la estimulación antigénica estaba infectado previamente, se produce una reacción inflamatoria local. En función de la rapidez en la respuesta y el número de células extravasadas se puede observar edema, exudado, necrosis (escara), dolor, enfisema subcutáneo, y hasta linfadenopatía regional. El antígeno que se emplea para la realización de la IDTB es un derivado proteico purificado (*Protein Purified Derivative*, PPD) obtenido a partir del cultivo de *M. bovis* (PPD bovina). El origen de la PPD se remonta al año 1932 cuando la bioquímica Florence Seibert (1897-1991) obtuvo un derivado proteico purificado a partir de *M. tuberculosis* crecido en medios de cultivo sintéticos y precipitado con ácido tricloroacético. Posteriormente, en 1934 consiguió un producto más purificado a partir de cepas de *M. bovis* cultivadas en el medio de Dorset que denominó PPD. La principal ventaja de este producto era que podía caracterizarse con cierto rigor y que su contenido proteico podía estandarizarse (Seibert, 1941).

La PPD bovina es un extracto de proteínas obtenido de filtrados de cultivos de *M. bovis* (cepa AN5) en medios sintéticos al que se le añade fenol como agente antimicrobiano en una proporción inferior a 0,5%. Se estima que su composición aproximada es 93% proteína, 6% polisacáridos y 1% ácidos nucleicos. Su pH puede oscilar entre 6,5 y 7,5 y se recomienda su conservación en refrigeración y protegido de la luz, aunque hay estudios que indican que es un producto muy estable a temperaturas superiores durante periodos prolongados (Maes et al., 2011). La naturaleza del producto y los procesos de producción dificultan controlar de forma precisa su composición final (Casal, 2015). Un estudio reciente caracterizó la composición proteica de la PPD bovina y aviar, las cuáles contenían 456 y 1019 proteínas respectivamente, compartiendo 103 proteínas que podrían ser responsables de las reacciones cruzadas entre ellas. Los autores obtuvieron, además, un complejo proteico por inmunopurificación que denominaron P22, el cual contenía las proteínas más inmunógenas y que se ha utilizado en el diagnóstico de TB en diversos estudios (Infantes-Lorenzo et al., 2017, 2018, 2019a, 2019b) (Figura 22).

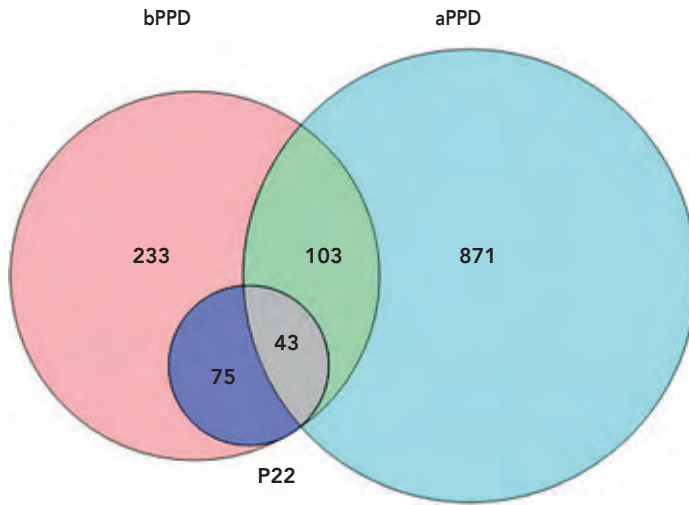


Figura 22. Número de proteínas caracterizadas en la PPD aviar (aPPD), PPD bovina (bPPD), P22 y compartidas entre sí.
Figura extraída del artículo de Infantes-Lorenzo et al. (2017).

La IDTBs consiste en la inoculación intradérmica en el tercio anterior del cuello del animal de PPD bovina (0,1 ml) de acuerdo con el Real Decreto 2611/1996 y la Directiva Europea 64/432/ECC. Previamente a la inoculación se ha de realizar un rasurado de unos 5 cm², evitando realizar rasurados demasiado extensos para que el punto de inoculación sea localizado correctamente, evitando errores de medición el día de la lectura. Es preciso comprobar que la piel esté limpia e íntegra en el lugar donde se va a realizar la inoculación. Antes de inocular la PPD, se debe realizar una medición (en mm) del pliegue cutáneo empleando un cutímetro homologado. De igual modo, el pliegue se mide 72 h (\pm 4 h) después por el mismo veterinario y con el mismo cutímetro, para minimizar una posible variabilidad debida al criterio del veterinario o al aparato de medición (MAPA, 2019b). La IDTBs se utiliza mayoritariamente en España para el diagnóstico de la TB bovina. A pesar de ciertas limitaciones, es una prueba que posee, en general, una Se elevada a nivel de rebaño, aunque algo más limitada a nivel individual (Álvarez et al., 2012a; Bezos et al., 2014). En cuanto a su Sp, también es elevada, aunque puede verse mermada en determinadas situaciones epidemiológicas, principalmente en infecciones con otras micobacterias (Biet y Boschioli, 2014; Mon et al., 2014; Infantes-Lorenzo et al., 2017, 2019b).

La otra variante de la prueba es la IDTBc, en la que se inoculara PPD aviar además de la PPD bovina. La PPD aviar es obtenida a partir de la cepa D4ER de *M. avium* subsp. *avium* y se inoculara en el mismo lado del cuello que la PPD bovina (con una separación mínima de 15 cm para evitar posibles interferencias

en la interpretación de la prueba) o en el opuesto. Esta prueba posee una mayor Sp en detrimento de la Se y, por ello, se recomienda su uso en situaciones de ausencia de TB, para reducir los falsos reactores positivos resultantes de una exposición a otras micobacterias (OIE, 2018). La IDTBc es también una prueba oficial recogida en la legislación (Real Decreto 2611/1996 y Directiva Europea 64/432/ECC), pero por su menor Se respecto a la IDTBs se recomienda su empleo en circunstancias epidemiológicas concretas, como regiones de baja prevalencia o explotaciones con medidas de bioseguridad adecuadas y sin antecedentes de TB.

Un aspecto fundamental para mejorar el rendimiento de la IDTB es que el veterinario que la realiza conozca determinados aspectos que pueden afectar a su rendimiento. Son numerosos los factores que se han demostrado que pueden tener un efecto sobre el resultado de la prueba de IDTB (ver capítulo 4.2.3.), aunque en términos generales se pueden destacar:

Factores relacionados con el hospedador

- **Inmunocompetencia:** el desarrollo adecuado del sistema inmune es fundamental para que el animal no solo pueda hacer frente al patógeno e impedir su diseminación cuando la infección tiene lugar, sino para poder reaccionar correctamente en las pruebas diagnósticas. Cualquier factor que afecte al estado inmunitario puede afectar, por tanto, al resultado de las pruebas diagnósticas (de la Rúa-Domenech et al., 2006). Incluso en situaciones en las que la respuesta inmune es adecuada, como en animales con infección latente y lesiones tuberculosas encapsuladas, se ha descrito que la respuesta inmune disminuye, debido posiblemente al menor estímulo antigénico que tiene lugar en esa situación, lo que puede conducir a una respuesta negativa en estos animales a pesar de estar infectados (Olea-Popelka et al., 2008). Tras el contacto inicial con el antígeno es necesario un periodo de tiempo mínimo para que se produzca la activación y diferenciación de los linfocitos (periodo pre-alérgico), mientras que después de un periodo de tiempo muy prolongado tras la infección puede tener lugar un fenómeno de anergia, periodos en los que el animal puede no reaccionar a la IDTB, a pesar de estar infectado (Buddle et al., 1995a; Lilenbaum et al., 1999; Pollock y Neill, 2002).
- **Edad:** el desarrollo insuficiente del sistema inmune del animal puede afectar al rendimiento de las pruebas diagnósticas (Mackay et al., 1989). La edad avanzada es un factor de inmunosupresión que compromete la eficacia del sistema inmune, hecho que favorece la infección (Ameni et al., 2007; Brooks-Pollock et al., 2013) y que se asocia, en general, con un aumento de los fallos diagnósticos (Munroe et al., 2000).

- Estrés: ante situaciones de estrés (manejo, transporte, etc.) se liberan glucocorticoides que suprimen varios mecanismos de interacción del sistema inmune (Brown et al., 1998), pudiendo alterar el rendimiento de las pruebas diagnósticas. En un estudio realizado para valorar el efecto del estrés sobre la IDTB y el test de detección de IFN- γ en ganado bovino, se administró un glucocorticoide sintético en animales sensibilizados e infectados de forma natural con *M. bovis*. Los animales que recibieron el fármaco presentaron respuestas intradérmicas significativamente inferiores en la IDTB así como una disminución de los valores de densidad óptica en el test de detección de IFN- γ , obteniéndose resultados falsos negativos en los animales infectados (Doherty et al., 1995). En general, el efecto del estrés en la IDTB ha sido escasamente documentado, aunque se ha descrito que ciertos animales (principalmente aquellos de razas criadas en régimen extensivo) son muy sensibles al estrés inherente al manejo al que se ven sometidos para realizar la prueba (Keck et al., 2018). También se ha descrito un mayor riesgo de transmisión de la enfermedad en las razas de aptitud láctea, asociado al mayor estrés que se produce durante el ordeño (Barlow et al., 1997).
- Raza/aptitud: cada raza, destinada para una aptitud determinada en función de sus capacidades productivas, se explota mediante un sistema de manejo concreto, por lo que en ocasiones es difícil discernir si el efecto se debe a la raza, la aptitud o al diferente manejo de los animales (Humblet et al., 2009). De hecho, se sospecha que los fallos diagnósticos relacionados con la raza pueden deberse a problemas en el propio manejo de la misma, principalmente en el caso de la IDTB, ya que requiere que el animal esté relativamente inmovilizado para realizar correctamente la prueba. El manejo se puede considerar, por tanto, un punto crítico para la realización de la prueba en aptitudes como el ganado de lidia. En un estudio realizado en nuestro país comparando la proporción de animales infectados negativos a la IDTB y/o al test de detección de IFN- γ en bovino de carne, leche y lidia, los animales de lidia presentaron una mayor proporción de falsos negativos en las dos pruebas diagnósticas, seguido del ganado de carne y, por último, del ganado de leche (Álvarez et al., 2014b). En el caso de la IDTB el resultado se podría justificar por una inadecuada realización de la misma (particularmente difícil de realizar en el ganado de lidia), pero también por una mayor carga de estrés en los animales de esta aptitud durante la realización de la prueba (Keck et al., 2018).

Factores no relacionados con el hospedador

- Tuberculina/técnica: la tuberculina debe superar unos controles de calidad antes de poder utilizarse para el diagnóstico de la TB (ver siguiente apartado). Entre los requerimientos que se exigen para que el reactivo sea

válido está el de tener suficiente potencia biológica (medida en Unidades Internacionales, UI), concretamente en cada dosis de 0,1 ml se deben inocular un mínimo de 2.000 UI, asegurando así una suficiente Se (Good et al., 2011a, 2011b). Existen varios fabricantes de tuberculina en Europa y todos los lotes que producen deben superar estos controles, pues el emplear tuberculinas de mala calidad está directamente relacionado con un menor rendimiento diagnóstico. Otros factores relacionados con la tuberculina o con la propia técnica son la correcta conservación y empleo (evitar contaminaciones durante su manipulación) de las PPDs bovina y aviar, así como el empleo de mangas adecuadas, especialmente con razas de manejo complicado (ejemplo, lidia), o el correcto mantenimiento y uso del material necesario para la prueba, incluyendo el cutímetro y las jeringas de inoculación, debiendo asegurar estas últimas la inoculación intradérmica de la PPD (Díez-Guerrier et al., 2018; Roy et al., 2019a). Las tuberculinizaciones sucesivas, especialmente si no se respetan los periodos mínimos entre pruebas, también se han sugerido como una causa de desensibilización, disminuyendo la capacidad de respuesta de los animales en la prueba IDTB (Coad et al., 2010).

- Especie/cepa causante de la infección/co-infecciones: la evolución de la infección y la severidad de la enfermedad dependen de varios factores, entre ellos, la virulencia de la cepa causante de la misma o la presencia de co-infecciones por otras micobacterias no tuberculosas (Álvarez et al., 2009; Bezos et al., 2010, 2014, 2015a) u otras enfermedades bacterianas o parasitarias que pueden alterar la respuesta inmune del animal, afectando también al diagnóstico (Bezos et al., 2015c; Naranjo Lucena et al., 2017). Evitar estas otras infecciones mediante vacunación o un correcto manejo y bioseguridad es, por tanto, fundamental. Si las medidas tomadas en las explotaciones no son suficientes para evitar otras posibles co-infecciones, es importante registrarlos de cara a identificar la causa de posibles fallos diagnósticos.
- Estacionalidad/ambiente: es un factor poco caracterizado y los estudios disponibles podrían tener cierto sesgo debido a que los saneamientos suelen concentrarse en periodos concretos, especialmente en el ganado en extensivo. La mayor supervivencia en el ambiente de las micobacterias o una exposición a las mismas en determinadas épocas del año puede condicionar los resultados de las pruebas diagnósticas. Tampoco hay que despreciar el efecto que las condiciones ambientales adversas (lluvia, temperaturas muy bajas, etc.) puedan tener sobre los resultados de la IDTB, e incluso reacciones de fotosensibilización, especialmente en los meses de mayor exposición al sol, pues podrían interferir en la correcta lectura e interpretación de la misma por parte del veterinario.

- Alimentación: una correcta alimentación de los animales se relaciona con un mejor estado inmunitario y, por tanto, con la posibilidad de reaccionar mejor en las pruebas diagnósticas. De hecho, la deficiente nutrición, como la carencia de vitaminas y minerales (como cobre y selenio) ya se ha correlacionado con una mayor susceptibilidad a la TB (Downs et al., 2008). No obstante, existen estudios en ganado bovino donde dicha correlación no se demostró (Costello et al., 1998). La actividad antibacteriana de la vitamina D ha sido descrita como un mecanismo protector frente a la TB, ya que su actividad principal es aumentar la producción de óxido nítrico, un potente agente antimicrobiano. Recientemente se ha observado una correlación entre los niveles de IL-32 y vitamina D (conversión de 25D a 1,25D) que facilita la actividad antimicrobiana de varios péptidos determinantes en el control de la infección (Corripio-Miyar et al., 2017; García-Barragan et al., 2018). El efecto protector de la vitamina D se ha sugerido tanto en ganado bovino (Rhodes et al., 2003) como en fauna silvestre (Risco et al., 2016).
- Fraudes: demostrar este tipo de actividades es difícil, por tanto, es complicado estimar la frecuencia real con que se producen. Sin duda, las consecuencias de las actividades fraudulentas encaminadas a producir falsos reactores positivos y negativos en la prueba IDTB son de gran trascendencia, con importantes repercusiones económicas y sanitarias, y pueden modificar la percepción que se tiene sobre la fiabilidad de la prueba oficial. Las modificaciones de los resultados de las pruebas (incluyendo aquellas debidas a cambios de los números de identificación de los animales) o la inoculación de sustancias irritativas, proinflamatorias o inmunosupresoras (principalmente corticosteroides) son las actividades que se sospecha tienen lugar con mayor frecuencia (ver capítulo 4.2.3.), si bien los efectos reales no han sido caracterizados con gran precisión (Doherty et al., 1995).

Importancia de la potencia biológica de la tuberculina y evaluación de rendimiento de la intradermoreacción (IDTB) en estudios de campo

Determinación de la potencia biológica de las PPDs

La metodología empleada para la valoración de la potencia biológica viene descrita por la OIE (2018), la Farmacopea Europea (01/2008:0536) y la Directiva Europea 64/432/CEE. Generalmente, se acepta que la potencia biológica de una PPD, definida como la capacidad para generar una DTH en sujetos sensibilizados, es similar entre preparaciones producidas por distintos fabricantes, aunque hay evidencias que ponen de manifiesto las diferencias existentes en función de la PPD utilizada tanto en la IDTB (Good et al., 2011a, 2011b), como en el test de detección de IFN- γ (Schiller et al., 2010). Como el contenido proteico presente en la PPD no

siempre es constante y no se correlaciona con la actividad biológica de la misma, es necesario que exista una estrategia para evaluar la potencia biológica de las tuberculinas *in vivo*. Para ello, la OIE dictaminó que los ensayos biológicos debían realizarse en cobayas infectadas o sensibilizadas de forma experimental, y preferentemente de forma adicional en las mismas especies de destino y en las mismas condiciones en las que las tuberculinas fuesen usadas (ganado bovino infectado de manera natural). Debido a las dificultades para disponer de ganado bovino infectado de manera natural y a los requerimientos técnicos e instalaciones de las que se ha de disponer, la mayor parte de los estudios se han realizado en cobayas sensibilizadas con *M. bovis* inactivado, que no requiere además de laboratorios BSL3 (Dobbelaer et al., 1983; Haagsma, 1986). Sin embargo, la antigua CEE y la Farmacopea Europea concluyeron que los resultados más fiables de potencia biológica de las PPDs son los obtenidos con cobayas infectadas con cepa viva, incluso comparado con ganado bovino infectado de forma natural (Casal, 2015). En 2002 se eliminó de la Directiva Europea 64/432/CEE la obligatoriedad de testar la potencia de las PPDs en ganado bovino infectado de forma natural. En las pruebas de potencia *in vivo* se compara la respuesta DTH producida por tuberculinas de distintos fabricantes entre sí y respecto al Estándar Internacional (*International Standard*, ISt), siendo necesario, entre otros criterios, que todas las tuberculinas tengan una potencia biológica entre el 66% y el 150% de la que viene declarada en su etiqueta (marcada por el fabricante), para que sean aptas para su empleo en el diagnóstico oficial. Cuando en 1986 se estableció el ISt (32.500 UI/ml) como tuberculina de referencia, se elaboró un único lote para evitar diferencias posteriores debidas a la variabilidad entre distintos lotes. Este lote de ISt está próximo a agotarse y se trabaja en la elaboración de un nuevo ISt para sustituirlo. El Laboratorio de Referencia Europeo (EU-RL) de Tuberculosis Bovina (Centro VISAVET, Madrid) participa en la validación de este nuevo ISt y tiene entre sus actividades más importantes, la evaluación y estandarización del protocolo de la prueba de evaluación de la potencia biológica de la tuberculina bovina en cobayas y ganado bovino.

Las PPDs que se emplean en las campañas de erradicación de la TB bovina están contrastadas por los laboratorios nacionales de referencia (en España el Laboratorio Nacional de Referencia de Santa Fe, Granada) y deben cumplir las especificaciones que figuran en la Directiva Europea 64/432/CEE. La dosis mínima de antígeno empleado actualmente se decidió tras haber realizado varios ensayos con PPDs de distintas potencias, de modo que en la actualidad es necesario que las tuberculinas posean al menos una potencia de 20.000 UI/ml [2.000 UI ($\pm 25\%$) por inoculación], y en condiciones en las que se considere que la reactividad de los animales puede estar comprometida, se recomienda emplear dosis de hasta 5.000 UI por inoculación (OIE, 2018). El empleo de una tuberculina con menor potencia biológica puede tener repercusiones negativas en el diagnóstico, produciendo falsos negativos. Sin embargo, el uso de una tuberculina con

una potencia biológica demasiado elevada puede incrementar el riesgo de falsas reacciones positivas producidas por infecciones por micobacterias no tuberculosas. Actualmente, la estandarización del proceso de producción y evaluación de las tuberculinas es de gran interés, ya que puede variar significativamente entre laboratorios. Ciertos estudios sugieren que diferentes lotes de PPDs pueden inducir reacciones DTH similares en los animales, pero las reacciones locales inducidas podrían presentar características diferentes a nivel histológico, lo que sugiere una correlación entre la histopatología y la presencia de ciertos tipos de proteínas en las diferentes PPD, derivadas del proceso de obtención (Cho et al., 2012). Asimismo, los avances en el campo de la proteómica en los últimos años han permitido identificar muchos de los componentes de las PPDs que se emplean actualmente en el diagnóstico de la TB (Infantes-Lorenzo et al., 2017).

Sensibilidad (Se) y especificidad (Sp) de la intradermoreacción (IDTB)

En las últimas décadas se han realizado multitud de estudios evaluando la Se y Sp de la IDTB, obteniéndose valores dispares en función de diferentes variables (condiciones epidemiológicas, criterios de interpretación, zonas de inoculación de la tuberculina, raza, aptitud, etc.). Existen diversas revisiones publicadas en este tiempo que concentran la mayor parte de los estudios publicados, estableciendo un amplio rango de valores de Se y Sp para la IDTBs e IDTBc tomando como referencia el cultivo bacteriológico (*gold standard*) (de la Rúa-Domenech et al., 2006; Bezos et al., 2014).

La Se de la IDTBs en diversos estudios incluidos en la revisión realizada por Domenech y colaboradores en 2006 oscilaba entre el 80,2% y el 100% y la Sp entre el 75,5% y el 96,8%. Para la IDTBc los valores de Se estuvieron entre el 68,6% y el 100% y la Sp entre el 88,8% y el 100%, siendo en general una técnica más específica que la IDTBs aunque menos sensible (de la Rúa-Domenech et al., 2006).

Puesto que el cultivo bacteriológico no está exento de limitaciones (puede haber animales infectados en los que el aislamiento no sea posible debido a un muestreo inadecuado, infección reciente, baja carga bacteriana en la muestra, etc.) se han desarrollado modelos que permiten calcular la Se y Sp de las pruebas diagnósticas con mayor precisión sin necesidad del *gold standard*. Un estudio realizado en España mediante una aproximación Bayesiana, basada en la utilización de valores previos de Se y Sp recogidos en la bibliografía, estimó una Se comprendida entre 53% y 69,4% para la IDTBs, y una Sp de casi el 99% (Álvarez et al., 2012a). En otro estudio similar realizado en Irlanda se evaluó la Se y Sp de la IDTBc, mostrando valores del 40,5-57,7% y del 96,3-99,7%, respectivamente, mejorando ligeramente al emplear un criterio severo de interpretación, es decir, considerando los animales dudosos como positivos (Lahuerta-Marín et al., 2018) (Tabla 6).

Tabla 6. Resultados de sensibilidad (Se) y especificidad (Sp) de la intradermorreacción (IDTB) simple (IDTBs) y comparada (IDTBc).

Incluido en la revisión bibliográfica de la Rua-Domenech et al. (2006) y en estudios mediante análisis Bayesiano realizados en España e Irlanda (Álvarez et al., 2012a; Lahuerta-Marín et al., 2018).

Test	Se	Sp	Referencia
IDTBs	100	88,6	Leslie et al., 1975
	91,2	75,5	Francis et al., 1978
	91	-	Domingo et al., 1995
	80,2	-	González-Llamazares et al., 1999
	86,4	90	Pollock et al., 2003
	-	96,8	Cagiola et al., 2004
	69,4	99,4	Álvarez et al., 2012a
IDTBc	-	100	Leslie et al., 1975
	91,4	99,9	Leslie et al., 1975
	95,5	97,8	O'Reilly y MacClancy et al., 1975
	68,6	88,8	Francis et al., 1978
	55,1	100	Neill et al., 1994
	93,3	-	Doherty et al., 1995
	90,9	-	Costello et al., 1997
	90,9	100	Ameni et al., 2000
	-	94	Buddle et al., 2001
	52-80	99-100	Quirin et al., 2001
	75-93,5	-	Norby et al., 2004
59	93	Lahuerta-Marín et al., 2018	

Es necesario indicar que en muchos estudios retrospectivos dirigidos a evaluar la Se/Sp, los datos de IDTB empleados para las estimaciones no proceden del saneamiento en que se detecta el brote, sino de posteriores, en los que la IDTB suele mostrar peores resultados en cuanto a Se, al existir teóricamente una menor prevalencia de infección y una mayor proporción de animales en fases recientes de la misma, que son más difíciles de detectar. Otro aspecto a tener en cuenta es el rendimiento variable que pueden tener las pruebas dependiendo de los factores comentados en secciones anteriores y que frecuentemente están presentes en los estudios en los que se evalúa la prueba de la IDTB.

La IDTBc es la prueba oficial de mayor Sp entre las disponibles. La Sp de la IDTBs es, en términos generales, elevada también, aunque en determinadas

situaciones epidemiológicas puede verse mermada, originando falsos reactivos positivos. Estas reacciones cruzadas pueden originarse por la presencia de otras micobacterias no tuberculosas, siendo las más comunes las incluidas en el complejo *M. avium* (MAC), como *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), causante de la enfermedad de Johne o PTB (Álvarez et al., 2008, 2009) (ver capítulo 4.2.3.).

En los últimos años, con el fin de incrementar la Sp de las pruebas diagnósticas para la detección de TB, se vienen realizando estudios para el desarrollo de antígenos alternativos a la PPD bovina para su empleo en la IDTB, en el test de detección de IFN- γ y en las pruebas basadas en la respuesta inmune de base humoral. El fundamento para desarrollar estos antígenos (mezclas de péptidos sintéticos y proteínas recombinantes como ESAT-6, CFP-10 o Rv3615c, entre otros) fue inicialmente la diferenciación de animales vacunados con BCG e infectados (estrategia DIVA), pues estaban ausentes en la cepa vacunal pero presentes en el resto de micobacterias del MTBC, aunque posteriormente se amplió al desarrollo de antígenos que mejorasen la Sp de las pruebas diagnósticas, especialmente de aquellas menos específicas, como la técnica de detección de IFN- γ . Para evaluar el rendimiento de los mismos se han realizado diversos estudios en animales, obteniendo el mejor rendimiento de Se y Sp al emplear una combinación de diversos antígenos (Bezós et al., 2014). La mayor limitación frente al uso de las PPD tradicionales es que ese incremento de Sp conlleva un cierto detrimento de Se, razón por la que su uso de rutina en situaciones de presencia de infección no se ha contemplado hasta la fecha.

A pesar del rendimiento variable que muestra la IDTB en los distintos estudios, es necesario remarcar que cuando se realiza correctamente y en condiciones favorables, su rendimiento es elevado, de hecho, es la herramienta diagnóstica con la que diversos países han conseguido alcanzar el estatus de oficialmente indemnes de TB bovina.

4.2.2. Ensayos de liberación de interferón gamma para el diagnóstico de tuberculosis (IGRAs)

Bernat Pérez de Val, Julio Álvarez, José Domínguez, Mariano Domingo, Javier Bezós

Historia y concepto

El uso de los ensayos de liberación de IFN- γ , conocidos como IGRAs (de su acepción en inglés: *Interferon-gamma release assay*), se remonta a finales de los años 80 del siglo XX cuando un equipo de científicos del CSIRO (Parkville,

Australia), liderados por Paul Wood, Jim Rothel y Tony Radford, desarrolló un método *in vitro* de inmunodiagnóstico de la TB bovina (Rothel et al., 1990) que cambió el paradigma del diagnóstico únicamente basado en la IDTB. Su idea fundamental era utilizar el IFN- γ , una citoquina que el hospedador utiliza en su respuesta inmunitaria frente a la infección para intentar eliminar los bacilos que causan la TB, como un marcador de la infección activa que pudiese ser detectado con fines diagnósticos.

El objetivo del método, ya desde su inicio, era complementar la IDTB para incrementar la Se global del diagnóstico de la TB bovina y así poder detectar las infecciones residuales que no se detectaban con esta prueba, lo que conducía a una prolongación de los brotes de TB (EFSA, 2012; Gormley et al., 2006).

A diferencia de la IDTB, el IGRA es un ensayo *ex vivo* e *in vitro* que consta de dos fases: (1) toma de muestra de sangre completa heparinizada que se envía de forma inmediata al laboratorio para su estimulación con antígenos de las micobacterias (en la prueba oficial del programa de erradicación de TB bovina serán PPD bovina y aviar) y posterior incubación a 37 °C durante 18-24 h y, (2) detección y cuantificación de IFN- γ liberado en el plasma sobrenadante a través de una técnica inmunoenzimática ELISA. De este modo, si un animal está infectado por TB y ha activado la respuesta inmunitaria frente a la infección, habrá células del sistema inmune (células T) circulando en sangre periférica capaces de reconocer de forma específica a los antígenos de las micobacterias causantes de TB. Así, cuando en el laboratorio se añaden antígenos de las micobacterias (por ejemplo PPD bovina), las células presentadoras de antígeno que también están presentes en la sangre (por ejemplo, macrófagos o células dendríticas) presentarán estos antígenos a las células T y éstas, como ya están activadas frente al patógeno, reconocerán los antígenos y como respuesta producirán una cantidad significativa de IFN- γ en un breve periodo de tiempo (16-24h), que podrá ser detectada y cuantificada por ELISA y comparada con los niveles de IFN- γ basales (sangre sin estimular) o de sangre estimulada con PPD aviar (Figura 23).

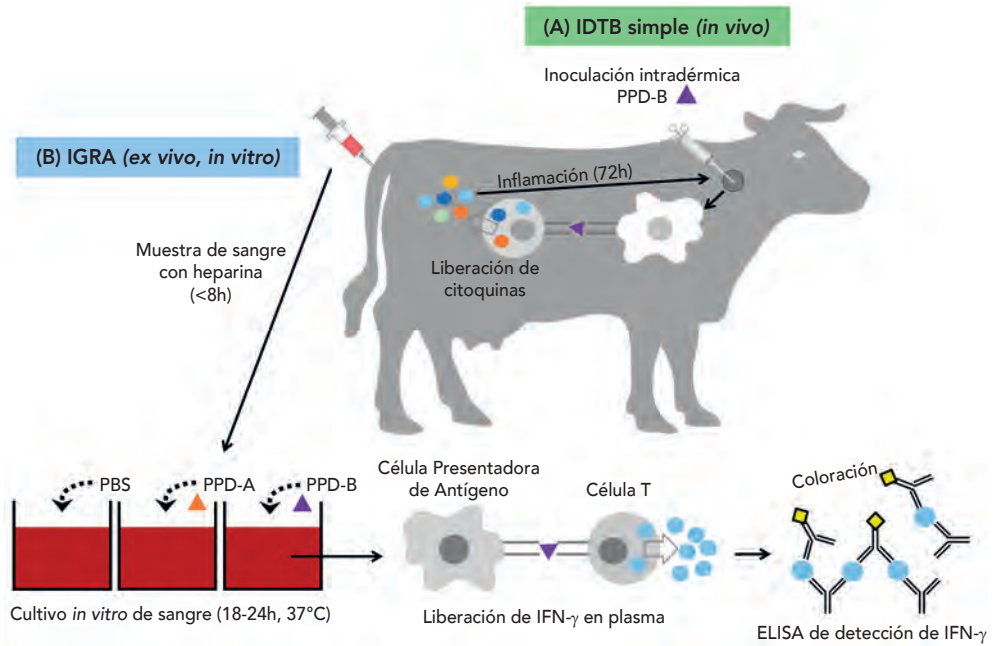


Figura 23. Fundamento de las pruebas diagnósticas basadas en la inmunidad mediada por células. A) Intradermorreacción (IDTB) simple: prueba *in vivo* en la que tras la inoculación intradérmica de la tuberculina (por ejemplo, tuberculina bovina, PPD-B) se produce la presentación antigénica a las células T activadas por la infección y éstas producen citoquinas, que a su vez generarán una respuesta inflamatoria local que se mide a las 72 h B) IGRA en sangre total: prueba *ex vivo* en la que sangre obtenida de forma reciente (< 8 h) se estimula *in vitro* con reactivos antigénicos (por ejemplo, tuberculinas aviar y bovina, PPD-A y PPD-B) manteniendo un control sin estimular en el que se añade solo diluyente (por ejemplo PBS). De forma equivalente a la IDTB, los antígenos se presentan a las células T previamente sensibilizadas y éstas producen y secretan interferón-gamma (IFN- γ), que será posteriormente detectado en plasma por medio de un ELISA de captura.

En España se empezó a utilizar la prueba a principios de los años 90; en concreto, en 1995, un grupo de la Universidad Autónoma de Barcelona publicó el primer estudio de diagnóstico comparado entre IGRA y IDTB, realizado en Cataluña (Domingo et al., 1995). Posteriormente, el uso del IGRA se fue implantando en los programas de erradicación y actualmente el IGRA basado en tuberculinas es considerado en la UE como prueba oficial complementaria para el diagnóstico de la TB bovina (Decisión de la Comisión de 8 de julio de 2002 que modifica la Directiva 64/432/CEE).

Tal fue el impacto de esta nueva tecnología, que también se desarrolló para el diagnóstico de la TB humana, un campo en el cual los IGRA también han ido ganando peso y han experimentado un gran desarrollo como se explicará en este capítulo.

IGRAs para el diagnóstico de tuberculosis en especies animales

Tras el desarrollo inicial del concepto IGRA, Wood y Rothel del CSIRO, conjuntamente con Stephen Jones y John Cox de la compañía CSL (Parkville, Australia), prosiguieron sus investigaciones mediante estudios de campo a gran escala (Wood et al., 1991), para desarrollar un producto útil en las campañas de erradicación de la TB bovina. Finalmente, CSL registró la tecnología y la comercializó a nivel global para el diagnóstico de TB en bóvidos con la marca Bovigam® (Wood y Jones, 2001) y también para primates (Primagam®) y cérvidos (Cervigam®). Aunque este último ya no está disponible a nivel comercial, otros equipos científicos internacionales han desarrollado un nuevo ensayo para cérvidos (Risalde et al., 2017), así como otras especies susceptibles a TB entre las que se incluyen camélidos (Rhodes et al., 2012), suidos (Pesciaroli et al., 2012), tejones (Dalley et al., 2008), elefantes (Angkawanish et al., 2013) o incluso leones (Maas et al., 2012).

Tras la introducción del kit Bovigam® (actualmente comercializado por Thermofisher Scientific), otro IGRA para bóvidos comercializado más recientemente, el kit ID Screen® Ruminant IFN-g (IDvet), también está siendo utilizado en los programas de erradicación de TB bovina. En ambos casos, los kits de IGRA se han desarrollado y evaluado principalmente teniendo en cuenta el uso de tuberculinas (PPD bovina y PPD aviar) como reactivos de estimulación de la sangre total de los animales. Las diferencias entre ambos kits en cuanto a la interpretación de resultados y su uso en diferentes situaciones epidemiológicas han sido estudiadas a fondo y sus implicaciones en la Se y la Sp del método diagnóstico se discuten con posterioridad en este capítulo.

Ambos kits, aunque desarrollados para su uso en programas de erradicación de TB bovina, permiten también el diagnóstico de TB en otros bovinos (como búfalos o bisontes), así como en caprinos (Bezoz et al., 2012c) y ovinos (Muñoz-Mendoza et al., 2016), debido a que la alta homología entre las secuencias aminoacídicas del IFN- γ entre estas especies posibilita que los anticuerpos de los kits los reconozcan. No obstante, el refinamiento de la técnica y su interpretación para mejorar la eficiencia del diagnóstico en estas especies es objeto de investigación.

En relación a la fauna silvestre, a pesar de que los IGRAs también han sido desarrollados en las principales especies reservorio (como jabalíes, ciervos o tejones), los requisitos del método (toma de muestras de sangre y cultivo *ex vivo* inmediato de la misma) no los hacen especialmente indicados para fines diagnósticos, más allá de estudios concretos de inmunidad en condiciones controladas, o para animales de centros zoológicos con más posibilidades de manejo. No obstante, en términos de investigación, el IGRA es una herramienta útil para estudiar la respuesta inmune de los animales a la

infección tuberculosa, o para valorar la inmunogenicidad de vacunas u otros inmunoestimuladores.

IGRAs para diagnóstico de tuberculosis en la especie humana

Hace ya más de una década que se introdujo en la práctica clínica la utilización de técnicas de inmunodiagnóstico *in vitro*, las cuales permiten diagnosticar la infección tuberculosa mediante pruebas de laboratorio. Básicamente, estas técnicas consisten en la estimulación *in vitro* de las células T circulantes en sangre, mediante antígenos específicos de *M. tuberculosis*. En el caso de que el individuo esté infectado, sus células T responderán liberando una amplia variedad de citoquinas que pueden ser detectables mediante técnicas inmunológicas. La citoquina detectada en las técnicas disponibles comercialmente es el IFN- γ . La principal virtud de los IGRAs comerciales radica en los antígenos que utiliza para la estimulación de las células T, la proteína 6-kD *early-secreted antigenic target* (ESAT-6) y la 10-kD *culture filtrate protein* (CFP-10), ambos codificados en la región de diferencia 1 (RD1) (Andersen et al., 2000). Estos antígenos específicos de las micobacterias causantes de TB no están presentes ni en el bacilo vacunal BCG (bacilo de Calmette-Guérin) ni en la mayoría de micobacterias ambientales.

Las dos técnicas disponibles comercialmente son el QuantiFERON®-TB Gold Plus (QFT-Plus) (Qiagen, Düsseldorf, Alemania) y el T-SPOT®-TB (Oxford Immunotec, Oxford, Reino Unido). El QFT-Plus permite identificar la respuesta por células T-CD4 y células T-CD8. La principal diferencia entre las dos técnicas IGRA reside en que mientras el QFT-Plus estimula sangre total y cuantifica la cantidad de IFN- γ liberado mediante ELISA, el T-SPOT-TB cuantifica el número de células T que producen IFN- γ en respuesta a la estimulación mediante ELISPOT. Los IGRAs también presentan otra potencial ventaja como es incluir controles negativos y positivos para identificar posibles reacciones inespecíficas y falsos resultados negativos (Domínguez et al., 2008). En este sentido, los IGRAs también se pueden ver afectados por la inmunosupresión, y su dificultad para responder a los antígenos de *M. tuberculosis*, si bien, los estudios realizados parecen indicar que el impacto sería menor que sobre la IDTB (Sester et al., 2014).

El principal objetivo del cribado de infección tuberculosa sería poder identificar y tratar a aquellos individuos que están infectados y que van a progresar a enfermedad activa. Sin embargo, tanto la IDTB como los IGRAs, en mayor o menor medida, únicamente detectan sensibilización a los antígenos, pudiendo ser tanto individuos con infección reciente y mayor riesgo de progresar, como individuos con infección antigua con muy bajo riesgo, o en los que el riesgo de progresar es nulo, pero que aún mantienen una

respuesta inmune frente a la micobacteria. Es decir, que la capacidad de la IDTB y de los IGRAs de predecir el desarrollo de TB es muy pobre, ya que un gran número de individuos con resultado positivo no progresarán hacia enfermedad tuberculosa (Diel et al., 2011). Sin embargo, aún con esta limitación, los IGRAs han mejorado significativamente el diagnóstico de la infección tuberculosa. A pesar de presentar valores predictivos similares, su mayor Sp ha permitido reducir el número de tratamientos preventivos innecesarios sin aumentar el riesgo de desarrollo de TB activa ulterior (Altet et al., 2015). Además, los IGRAs han mejorado la detección de infección tuberculosa en pacientes inmunodeprimidos.

Reactivos

Más allá de los kits de ELISA o ELISPOT para la detección de IFN- γ mencionados en apartados anteriores, los IGRAs requieren reactivos para estimular los linfocitos de sangre periférica y que éstos produzcan la citoquina en cuestión. Las tuberculinas consisten en una mezcla de proteínas, hidratos de carbono y lípidos obtenidas de las micobacterias (Tameni et al., 1998), y esta composición tan variada ofrece la ventaja de una elevada Se de los métodos diagnósticos basados en tuberculinas debido a la gran cantidad de antígenos de micobacteria que contienen. Por el contrario, este hecho puede suponer una pérdida de Sp, debido a que algunos de estos antígenos son compartidos por micobacterias no tuberculosas. La identificación de antígenos presentes solamente en las micobacterias tuberculosas, pero no en otras micobacterias, y por tanto, más específicos, ha permitido desarrollar nuevos reactivos con mayor Sp que las tuberculinas. Las proteínas ESAT-6 y CFP-10, como antígenos específicos de la mayoría de micobacterias tuberculosas, son las más estudiadas para su uso en los IGRAs y se incorporan como reactivos en casi todas las nuevas generaciones de IGRAs para el diagnóstico de la TB animal o humana (Vordermeier et al., 2001; Pai et al., 2004), aunque en el primer caso todavía no existen para uso comercial ni con protocolos armonizados.

La investigación y el desarrollo de estos nuevos reactivos está muy vinculado a la necesidad de obtener formulaciones que igualen o mejoren la eficiencia de las tuberculinas y que incrementen la Sp del diagnóstico, evitando reacciones frente a micobacterias no tuberculosas. Del mismo modo, se eliminaría la interferencia diagnóstica en un hipotético escenario en el que se utilizara la vacuna atenuada BCG (Vordermeier et al., 2016b), ya que desafortunadamente, la vacunación con BCG sensibiliza a los individuos frente a las tuberculinas, comprometiendo seriamente la Sp del diagnóstico de TB. Por este motivo, los nuevos antígenos específicos concebidos para reemplazar a la tuberculina, tanto en los IGRA como en la prueba de IDTB, se están desarrollando para las denominadas pruebas DIVA

(de su acepción en inglés: *differentiation of infected from vaccinated animals*), que permiten diferenciar aquellos animales con una infección de los vacunados no infectados.

Entre los reactivos DIVA, los antígenos ESAT-6 y CFP-10 han sido evaluados en pruebas de campo en bovinos y caprinos, ya sea formulados como cóctel peptídico, cóctel proteico o como proteína de fusión (Waters et al., 2004a; Cockle et al., 2006; Pérez de Val et al., 2016). El antígeno TB7.7. también se ha incorporado en IGRAs comerciales para el diagnóstico de la TB humana (Diel et al., 2008), pero una de sus limitaciones es que el gen que codifica este antígeno no está presente en el genoma de las principales variantes causantes de TB animal por lo que su uso no es apto para veterinaria. Otros antígenos como Rv3615c (Sidders et al., 2008; Millington et al., 2011) o Rv3020c (Jones et al., 2012) han sido evaluados más recientemente para su potencial uso en el inmunodiagnóstico de la TB humana y/o animal, con resultados prometedores en estudios de laboratorio realizados en condiciones controladas, aunque será necesario contrastarlos con estudios de campo a gran escala.

Finalmente, el complejo multiproteico P22, obtenido a partir de la PPD bovina y desarrollado principalmente para el diagnóstico serológico de TB, también puede ser un buen candidato para reemplazar a las tuberculinas en las pruebas de IDTB e IGRAs, ya que contiene muchas proteínas inmunogénicas de la PPD bovina en alta concentración, mientras que, por otro lado, comparte muchos menos antígenos con la PPD aviar que la propia PPD bovina (Infantes-Lorenzo et al., 2017).

Condiciones del ensayo

Como se ha comentado anteriormente, los IGRAs constan de dos fases bien diferenciadas: (1) una primera consistente en la extracción de la muestra de sangre de los animales y su remisión al laboratorio, donde se estimula con los antígenos (PPDs o antígenos específicos, Figura 24A) y posteriormente se incuba durante 18-24 h a 37 °C (Figura 24B), y una segunda fase (2), consistente en la detección del IFN- γ liberado con un ELISA de captura comercial (Figura 24C). La primera fase puede considerarse la más crítica, pues existen diversos factores que pueden afectar a los resultados obtenidos. La segunda fase de realización del ELISA no es compleja si la realiza personal experimentado, aunque hay aspectos del protocolo (el criterio de interpretación, entre ellos) que pueden diferir entre kits y la aplicación bajo la norma en los diferentes países, afectando a la Se y/o Sp de los resultados (Schiller et al., 2009; Bezos et al., 2011a).

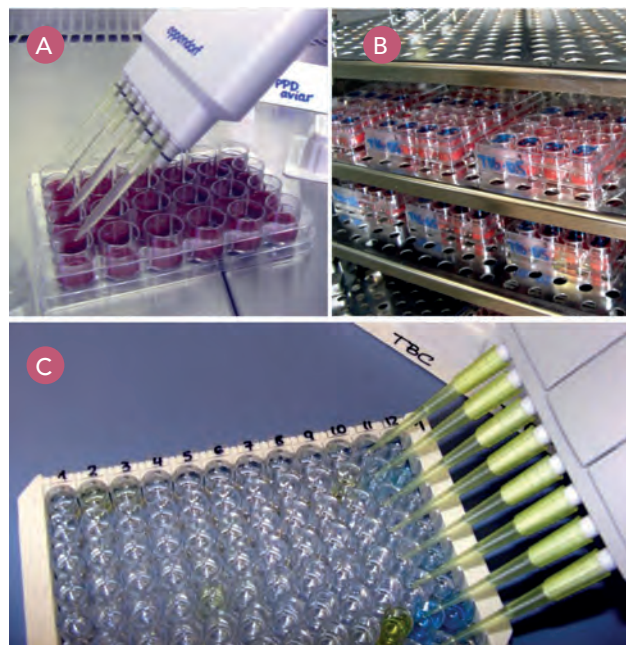


Figura 24. Realización del IGRA en sangre completa.

A) Estimulación de sangre heparinizada obtenida a partir de cada individuo con los antígenos. B) Incubación a 37 °C y 0,5% de CO₂ durante 18-24 h C) Realización del ELISA de detección de interferón-gamma (IFN- γ) en el plasma sobrenadante obtenido a partir de las sangres estimuladas.

Actualmente, se conocen diversos factores que afectan al rendimiento de la prueba IGRA para el diagnóstico de la TB bovina y, por tanto, que condicionan su uso. Se describen a continuación algunos de los más importantes.

Un factor a tener en cuenta al aplicar IGRA en una explotación es el momento en el que se realizó la última IDTB. Aunque existen resultados contradictorios al respecto, numerosos autores describen que una IDTB reciente puede modificar sustancialmente la Sp de la prueba (de la Rua-Domenech et al., 2006; Schiller et al., 2010). De acuerdo con el protocolo vigente en España, el test de detección de IFN- γ debe realizarse en muestras procedentes de animales en los que no se haya aplicado la IDTB en un periodo mínimo de 60 días (MAPA, 2019b), asegurando así la ausencia de dicho efecto.

Con el fin de evitar respuestas inespecíficas, la técnica IGRA tampoco se recomienda para el diagnóstico oficial en animales menores de 6 meses (Mackay et al., 1989). También se hace necesario el empleo de tubos con heparina de litio al realizar la recogida de la sangre, ya que el uso de otro anticoagulante puede interferir en la prueba (Rothel et al., 1992). Para que los linfocitos produzcan

IFN- γ en respuesta a la estimulación es esencial que se extremen las medidas para garantizar su viabilidad, tanto al realizar la recogida de la sangre como en el transporte de la misma (evitando, por ejemplo, variaciones muy marcadas de temperatura), ya que cualquier daño y/o alteración en el proceso puede disminuir sustancialmente la población de linfocitos y, por tanto, alterar la producción de IFN- γ (Okafor et al., 2014). Por esta razón, se recomienda el transporte de la sangre a temperatura ambiente (18-22 °C), nunca refrigerada o congelada.

Otro de los puntos críticos que presenta este test diagnóstico es el tiempo que transcurre desde que se recoge la sangre en la explotación hasta que se realiza la estimulación de la misma en el laboratorio (Schiller et al., 2009). Este parámetro es un factor limitante en ciertas regiones, debido al número y accesibilidad de los laboratorios capacitados para realizar la técnica, lo que puede hacer necesario considerar periodos prolongados en ciertas regiones o países. Originalmente se recomendaba que este intervalo no excediera las 16 h (Rothel et al., 1992), aunque actualmente en España se recomienda que la estimulación de la sangre se realice en las 8 primeras h tras su recogida (MAPA, 2019b). Esta práctica se basa en estudios que demostraron que, a medida que se incrementaba el tiempo entre la recogida y la estimulación de la sangre, los valores de densidad óptica obtenidos en el ELISA disminuían (relacionado con la destrucción progresiva de los linfocitos en la muestra una vez extraída), reduciendo de forma significativa la Se de la técnica y traducándose en la clasificación errónea de animales infectados como negativos (falsos negativos), tanto en ganado caprino como en bovino (Gormley et al., 2004; Bezos et al., 2011a). En un estudio realizado por Gormley y colaboradores en ganado bovino, se observó una disminución significativa de la Se del IGRA al emplear muestras estimuladas 24 h tras su recogida en comparación con aquellas estimuladas tras 8 h (Gormley et al., 2004). Años más tarde, en otros estudios realizados por Coad y colaboradores en Gran Bretaña y Waters y colaboradores en Estados Unidos, no se observó un cambio en la cantidad de IFN- γ detectado en las muestras procedentes de siete animales infectados de forma experimental al realizar el test de detección de IFN- γ con muestras estimuladas 8 y 24 h tras su extracción (Coad et al., 2007; Waters et al., 2007), si bien, en el segundo, los animales incluidos eran menores de 6 meses y quizá este hecho pudo afectar a los resultados obtenidos. Sin embargo, en un estudio realizado por Schiller y colaboradores, en ganado libre e infectado de forma experimental y natural (aproximadamente 200 animales en cada grupo), se demostró de nuevo que la estimulación de las muestras transcurridas 24 h desde la recogida, en lugar de las 8 recomendadas, ocasionaba una cierta disminución de la Se de la prueba (Schiller et al., 2009).

Respecto al ELISA empleado en la segunda fase de la prueba IGRA para la detección de IFN- γ liberado por los linfocitos, es necesario indicar que existen diferentes pruebas comerciales para ganado bovino, siendo muy parecidas en

cuanto al protocolo, pero dejando algunos aspectos del mismo a criterio del laboratorio/país donde se realiza el ensayo, lo que dificulta la estandarización y puede provocar diferencias en los resultados. Entre las tareas del Laboratorio de Referencia Europeo (EU-RL) de TB bovina figura la de la armonización de las técnicas empleadas para el diagnóstico de la TB bovina. Hace unos años, con origen en una opinión de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) sobre la posibilidad de emplear IGRA con idéntico propósito que la IDTB en el contexto de los programas de erradicación, se puso de manifiesto la importancia de una armonización previa de la técnica (EFSA, 2012). Entre los factores estudiados, se identificaron algunos que eran críticos, pues podían modificar sustancialmente los resultados, y que se sumaban a los anteriormente comentados. Entre estos factores destacaban: (1) la potencia biológica de las tuberculinas empleadas para la estimulación de la sangre, (2) la cantidad de tuberculina empleada para dicha estimulación, (3) las condiciones de conservación de los plasmas empleados en el ELISA o (4) el criterio de interpretación de resultados aplicado. Todos estos factores fueron analizados, recomendándose ciertas directrices como: (1) el empleo de tuberculinas que cumplieren los criterios de la OIE y la Farmacopea Europea en lo relativo a potencia biológica, (2) el uso de una concentración de tuberculina para la estimulación de 20 µg/ml o (3) el empleo de plasma refrigerado durante un máximo de 7 días o congelado en caso de tiempos superiores. Respecto al criterio de interpretación aplicado, hay que remarcar que puede variar entre los diferentes fabricantes, pero normalmente está condicionado por la situación epidemiológica existente en cada país. Por ejemplo, en España el criterio de interpretación es previamente definido por el MAPA en consenso con diversos expertos en la materia, teniendo en cuenta resultados de experimentos que corroboren el criterio óptimo para alcanzar los objetivos buscados. En condiciones óptimas, el criterio empleado debería de tener en cuenta las particularidades de la respuesta inmunitaria frente a la infección, y ser robusto frente a las diversas situaciones epidemiológicas que puedan presentarse en los rebaños (por ejemplo, interferencia de otras micobacterias no tuberculosas).

Sensibilidad (Se) y especificidad (Sp)

Desde las primeras aplicaciones de las pruebas IGRA para la detección de animales tuberculosos a finales de los años 80/principios de los 90 se han realizado numerosos trabajos para la evaluación de la Se y Sp de éstas, ofreciendo una considerable variabilidad en las estimaciones. De acuerdo a un meta-análisis publicado recientemente y que consideró aquellos trabajos que aportaron resultados evaluables de Se y Sp de IGRAs (27 artículos y 172 estimaciones en el caso de la Se, y 19 artículos y 145 estimaciones en el caso de la Sp) (Downs et al., 2018), la Se global del IGRA basado solamente en el uso de la PPD bovina sería del 84-87%

(intervalo de credibilidad del 95% de 72-95%) y su Sp del 91-97% (IC 95% de 86-98%) (Nuñez-García et al., 2018). En el caso del IGRA basado en el uso de PPD bovina y PPD aviar, más utilizado en la actualidad, dichos valores serían del 67-83% (IC 95% de 49-92%) en el caso de la Se y del 94-98% (IC 95% de 88-99%) en el caso de la Sp (Nuñez-García et al., 2018). Estos valores están en los rangos de los descritos una década antes en otra revisión sobre diagnóstico de TB bovina basada en los primeros trabajos realizados con IGRA, y que ofrecía unas estimaciones de Se del 88% (rango 73-100%) y de Sp del 97% (rango 85-99%) (de la Rúa-Domenech et al., 2006). La mayor parte de trabajos realizados coinciden en describir la mayor Se de las técnicas de IGRA comparadas con las pruebas cutáneas (y su menor Sp). Estas dos revisiones ponen de manifiesto las grandes diferencias que pueden esperarse entre estudios enfocados a determinar el rendimiento de los IGRAs. El origen de estas diferencias en las estimaciones de la Se y Sp de la técnica puede encontrarse en varios factores relacionados con la propia prueba evaluada (uso de diferentes kits comerciales, puntos de corte, y todas aquellas variaciones en las condiciones del ensayo revisadas en el punto anterior y que afectarán al resultado de la técnica), pero también en los referentes al diseño del estudio (fundamentalmente la población analizada y el tipo de análisis realizado para la determinación de la fiabilidad de la prueba, dos aspectos que están íntimamente relacionados).

Con respecto a la población analizada cabe destacar la variedad de criterios elegidos para la selección de animales incluidos en estudios de evaluación de IGRAs. La aproximación tradicional ha sido utilizar animales con un estado de infección (infectado/libre de enfermedad) conocido, mediante el uso de información complementaria, que permita construir un criterio de referencia o *gold standard*. En el caso de trabajos destinados a la determinación de la Sp de la prueba, la estrategia más sencilla es sin duda el uso de animales procedentes de explotaciones/regiones certificadas como libres de TB o con un riesgo de infección considerado muy bajo, ya que en este caso todos los reactores positivos pueden ser considerados directamente como falsos positivos (Cagiola et al., 2004; Vordermeier y Ewer, 2006; Antognoli et al., 2011; Gormley et al., 2013). Del mismo modo, en el caso de los estudios encaminados a la evaluación de la Se, una estrategia utilizada comúnmente es el uso de animales cuya estado de infección es conocido, lo cual puede obtenerse de dos maneras fundamentalmente: animales infectados experimentalmente (Rothel et al., 1992; Waters et al., 2004b; Denis et al., 2007; Schiller et al., 2009) o animales cuya infección se ha confirmado mediante otras pruebas diagnósticas, normalmente *post mortem* (detección de lesiones compatibles con TB y/o cultivo bacteriológico) (Schiller et al., 2009; Aagaard et al., 2010; Marassi et al., 2010; Antognoli et al., 2011). En numerosos estudios, no obstante, se combinan las diferentes poblaciones (animales de rebaños libres, animales infectados experimentalmente y animales con infección

confirmada mediante otras pruebas) para obtener resultados globales de Se y Sp. Todas estas estrategias basadas en la existencia de un criterio de referencia tienen importantes limitaciones, que pueden llevar al análisis de poblaciones no representativas de aquella en la que se utiliza la prueba posteriormente, lo que puede producir resultados sesgados y engañosos. En el caso del análisis de animales de rebaños/regiones libres de TB, puede que éstos estén expuestos a diferentes factores/estímulos antigénicos comparado con los animales no infectados en zonas (o rebaños) donde la enfermedad sí está presente (por ejemplo, debido a una mayor o menor prevalencia de micobacterias ambientales que den lugar a reacciones cruzadas en las zonas libres de enfermedad, lo que provocaría una subestimación o sobreestimación de la Sp, respectivamente). El uso de animales infectados experimentalmente puede también generar resultados sesgados ya que, debido a la alta carga usada en dicha infección, estos animales experimentarán con frecuencia una respuesta inmune más intensa y, por tanto, más fácilmente detectable (lo que puede llevar a sobreestimar la Se de la prueba). Por último, en el caso de los animales con un estado de infección conocida (normalmente con lesiones visibles macroscópicamente y/o un cultivo positivo), debido al tiempo requerido normalmente para el desarrollo de dichas lesiones y/o la multiplicación de las micobacterias hasta niveles detectables mediante bacteriología, su uso implica normalmente la consideración exclusivamente de animales en fases relativamente avanzadas de la enfermedad que serán, por tanto, más fácilmente detectables, lo que una vez más puede llevar a una sobreestimación de la Se.

Es por esto que en los últimos años se ha venido realizando un tipo de análisis alternativo al de poblaciones definidas por un *gold standard*, basado en el análisis de clases latentes (*Latent Class Modeling*, LCM), normalmente realizado utilizando técnicas de modelización Bayesianas (Clegg et al., 2011; Álvarez et al., 2012a; EFSA, 2012; Pucken et al., 2017; Al-Mouqatea et al., 2018; de la Cruz et al., 2018; Lahuerta-Marín et al., 2018). Dichas técnicas se basan en el cálculo de la Se y la Sp de la prueba diagnóstica a evaluar en poblaciones cuyo estado real de infección se desconoce, pero que puede estimarse a partir de un cierto conocimiento previo sobre el grado de infección (y la Se y Sp esperada de las pruebas), particularmente en el caso de que haya resultados disponibles de otras pruebas diagnósticas (Enøe et al., 2000; Branscum et al., 2005). Esta aproximación tiene el inconveniente de depender parcialmente de la disponibilidad (y fiabilidad) de esa información *a priori*, si bien su impacto sobre las estimaciones de Se y Sp puede evaluarse. A cambio, tiene la ventaja de no depender de la precisión de una técnica de referencia (el *gold standard*) que, en el caso del diagnóstico de la TB bovina, en la práctica no existe (dado que el cultivo, tradicionalmente usado como prueba de referencia, tiene una Se limitada). Si bien existen diferencias en los protocolos evaluados y las poblaciones animales estudiadas (en términos de prevalencia de enfermedad, raza, etc.) en los distintos estudios basados en LCM,

los valores descritos en los mismos oscilan alrededor del 70-95% en el caso de la Se y del 75-99% en el caso de la Sp, con la notable excepción de un estudio realizado sobre 175 animales sometidos a la prueba de IDTB 2-28 días antes en Alemania que ofreció valores de Sp por debajo del 30% en lo que fue el primer uso de esta prueba en condiciones de campo en el país, y en el que también se describe un muy bajo nivel de acuerdo entre los resultados de la prueba de IGRA en distintos laboratorios, lo que sugiere que dichos resultados pueden no ser representativos del rendimiento de la prueba en otras situaciones (Pucken et al., 2017).

Perspectivas de futuro

Los IGRAs, fundamentalmente los utilizados para el diagnóstico de la TB humana, han evolucionado tanto en su procedimiento técnico (diferentes generaciones de ELISA y ELISPOT a partir de sangre total y células del sistema inmune aisladas de sangre periférica, respectivamente), como en el uso reactivos más específicos que las tuberculinas. Por el contrario, en el diagnóstico de TB animal, y concretamente de la TB bovina, los procedimientos de los IGRAs no son muy diferentes a los que utilizaban Rothel y Wood 30 años atrás.

A corto plazo y a escala europea es necesario que los fabricantes de los kits, conjuntamente con el EU-RL de TB bovina y los laboratorios de referencia nacionales y regionales, colaboren en la armonización y estandarización de los protocolos, características óptimas para el ensayo e interpretación de resultados de los kits IGRA disponibles para el diagnóstico de la TB bovina, con el objetivo de evitar la disparidad de datos de Se y Sp del método que esta carencia ocasiona. También será necesario que, paralelamente al desarrollo de nuevos reactivos basados en antígenos definidos, se trabaje en las características que debería tener una "tuberculina de referencia", que pueda emplearse como reactivo estimulante único en los kits IGRA, y que sea también utilizada por los fabricantes de los kits para estandarizar la interpretación de resultados en sus laboratorios.

Las tuberculinas son preparados antigénicos obtenidos a partir de micobacterias inactivadas por calor que contienen diversos antígenos, que generan reacciones cruzadas debidas a la exposición a otras micobacterias no patógenas. Por ello, a medio plazo, las técnicas actuales deberán ser mejoradas substancialmente por la vía del reemplazo o la depuración de las tuberculinas, desarrollando otros reactivos que contengan antígenos más específicos (Schiller et al., 2011). Las técnicas de diagnóstico de TB bovina basadas en tuberculinas, fundamentalmente la IDTB, fueron concebidas para diagnosticar la enfermedad a nivel de rebaño, pero el incremento del comercio internacional está implicando cambios en el diagnóstico de enfermedades como la TB animal, por ejemplo, en la necesidad

de incrementar el peso de los controles pre-movimiento. Este hecho, conjuntamente con la necesidad de implementar estrategias de control y vigilancia sanitaria alternativas, desde la perspectiva de países y regiones con el estatus de oficialmente libres de TB, requerirán un mayor nivel de fiabilidad diagnóstica para identificar la infección a nivel individual.

El empleo de las tuberculinas también supone la principal limitación para el uso de vacunas frente a la TB animal, ya que la vacuna BCG u otras vacunas basadas en micobacterias, generan interferencias en el diagnóstico al contener la mayoría de los antígenos de las tuberculinas. Para superar esta limitación es necesario el uso de reactivos DIVA que sean como mínimo tan sensibles como las tuberculinas (Vordermeier et al., 2016b). Un estudio realizado en Gran Bretaña, utilizando un modelo de transmisión de la TB bovina intra-rebaño, concluyó que la vacunación con BCG en diferentes escenarios, requeriría un diagnóstico con una Sp superior al 99,85% para ser efectiva en términos de coste-beneficio (Conlan et al., 2015), aunque este valor de Sp puede ser alcanzable con los reactivos de diagnóstico DIVA evaluados hasta la fecha, modificando puntos de corte de la técnica (Vordermeier et al., 2016b). El reto recae en mantener niveles de Se similares al de las pruebas basadas en tuberculinas. Por ello, uno de los principales desafíos que se plantean es la identificación de antígenos adicionales que complementen los reactivos DIVA ya existentes para IGRAs (ESAT-6, CFP-10 y RV3615c), con el objetivo de mejorar su Se sin afectar su Sp. Los nuevos reactivos suelen ser evaluados principalmente en estudios llevados a cabo en condiciones de laboratorio, pero para su desarrollo, será necesario evaluarlos también en estudios de campo testando animales vacunados.

Finalmente, otro elemento a explorar es la posibilidad de iniciar la estimulación de las sangres desde el momento de su extracción en el rebaño. Esta posibilidad requeriría el desarrollo de innovaciones tecnológicas (como ya se hizo en los IGRAs para diagnóstico de TB humana mediante el uso de tubos de extracción que ya contienen los antígenos), y también sería necesario el uso de equipos que permitan iniciar la incubación durante el transporte de las muestras, ya que se ha descrito que la temperatura mínima para la incubación es de 33 °C (Schiller et al., 2009), aunque no es necesario que ésta se realice con aporte de dióxido de carbono (como suele realizarse en el laboratorio). Estas innovaciones facilitarían la implementación de los IGRAs en los programas de erradicación, sobre todo en explotaciones grandes o situadas en regiones remotas o de difícil acceso, hecho que limita la posibilidad de trasladar las muestras al laboratorio para la realización de la estimulación en el periodo óptimo de tiempo.

4.2.3. Interferencias en el diagnóstico ante mortem

Álvaro Roy, Julio Álvarez, Catalina Picasso-Risso, Antonio Rodríguez-Bertos, Javier Bezos

Interferencia en el diagnóstico ante mortem causada por *Mycobacterium avium* subespecies *paratuberculosis* (MAP)

La similitud antigénica entre los agentes etiológicos de la TB y la PTB puede originar respuestas inmunes en el animal que afecten al resultado de las pruebas de IDTB y/o IGRA, limitando el diagnóstico certero de una o ambas enfermedades a nivel individual y de rebaño (Gilot y Cocito, 1993). La caracterización detallada de este efecto es, sin embargo, difícil de estudiar debido a las limitaciones de las pruebas usadas como referencia para determinar el verdadero estado de infección de TB y/o PTB (normalmente el cultivo, con una Se limitada en el caso de ambas enfermedades).

No obstante, en las últimas décadas se han realizado varios estudios intentando cuantificar el grado de interacción diagnóstica entre TB y PTB. En los mismos, se ha evaluado el uso de IDTB y/o IGRA en poblaciones animales naturalmente infectadas con TB (Lilenbaum et al., 2009), PTB (Dunn et al., 2005; Brito et al., 2014; Kennedy et al., 2014), coinfectadas (Aranaz et al., 2006; Álvarez et al., 2009) o libres de ambas enfermedades (Vargès et al., 2009). Estos trabajos han descrito una situación diversa, incluyendo tanto resultados que sugieren la ausencia de interferencia (Dunn et al., 2005), como un incremento de la probabilidad de detectar reactivos a TB en rebaños en los que se detectaban reactivos por serología a PTB (Byrne et al., 2019, Picasso-Risso et al. 2019a). Esto podría deberse a un mayor riesgo de infección por TB en rebaños con PTB debido a la presencia de factores de riesgo comunes a ambas enfermedades, o bien a una mayor reactividad en las pruebas de TB en animales infectados o expuestos al agente causal de la PTB.

El análisis del resultado a las pruebas diagnósticas a nivel individual revela un efecto que en rebaños en los que se constata la presencia de PTB, la Sp de la IDTBs (ya sea caudal o cervical) y la del IGRA pueden verse afectadas (Aranaz et al., 2006; Brito et al., 2014; Seva et al., 2014). Así, animales positivos a PTB por serología (Aranaz et al., 2006; Brito et al., 2014; Seva et al., 2014; Picasso-Risso et al., 2019a) o cultivo (Brito et al., 2014; Seva et al., 2014) tuvieron una mayor probabilidad de ser positivos a las pruebas de TB en comparación con los negativos a PTB, lo que podría derivarse de la existencia de reacciones cruzadas causadas por la inmunidad inducida por MAP. En el caso de rebaños en los que se confirma la ausencia de TB, la frecuencia de aparición de estas reacciones inespecíficas debidas a la PTB puede limitarse en gran medida mediante el uso de la prueba

de IDTBc, en la que se comparan las reacciones inmunes generadas localmente tras la inoculación de PPD bovina y PPD aviar en el animal y que puede, por tanto, identificar animales con una gran respuesta a micobacterias del MAC (como el agente causal de la PTB). Otra alternativa para aumentar la Sp en rebaños libres de TB desarrollada más recientemente es el uso de antígenos más específicos (ausentes en micobacterias no asociadas a TB), como el ESAT-6 y CFP-10, y cuyo uso se ha explorado más en el caso de la prueba de IGRA, si bien, puede ir asociado a un cierto descenso en la Se.

En el caso de rebaños en los que ambas enfermedades co-existan se ha comprobado que la infección con PTB puede dar lugar a un descenso de la Se de las pruebas de IDTB e IGRA, disminuyendo la capacidad de detectar animales con TB en un 5-15% (Seva et al., 2014; Nuñez-García et al., 2018) y en un 5-10% (de la Rúa-Domenech et al., 2006; Álvarez et al., 2009, 2012a), respectivamente. Esta falta de Se es más patente en animales con altos niveles de anticuerpos específicos frente a MAP y con lesiones entéricas difusas, indicativas de estados avanzados de PTB, que podrían conllevar un agotamiento de la respuesta inmune celular del animal y, por tanto, la imposibilidad de ser detectados mediante pruebas rutinarias de TB (Álvarez et al., 2008, 2009; Seva et al., 2014). Igualmente, la coinfección por TB y PTB puede afectar al rendimiento de la IDTBc, ya que los animales que sufren ambas enfermedades pueden mostrar una fuerte respuesta a la PPD bovina pero también a la PPD aviar, de modo que ésta última enmascare la primera (Picasso-Risso et al., 2019a). Esto podría conducir a la aparición de falsos resultados negativos en la prueba en animales infectados por TB, lo que resalta el posible riesgo asociado al uso de este método diagnóstico en rebaños con PTB y en los que esté presente o exista un riesgo de infección por TB.

La interferencia diagnóstica entre TB y PTB no afecta únicamente al diagnóstico de TB, sino que también puede afectar al resultado en las pruebas para la detección de PTB. Así, la reciente (menos de 90 días) o frecuente (>3 veces) inoculación de PPD bovina puede incrementar la probabilidad de obtener respuestas positivas a serología de PTB (Picasso-Risso et al., 2019b). Igualmente, en animales con TB y PTB, también se ha descrito un descenso en la Se de las pruebas de TB (IGRA) (Álvarez et al., 2009), lo que pone de manifiesto una vez más la compleja interacción entre la respuesta inmune originada en respuesta a la infección por ambos patógenos.

Interferencia en el diagnóstico ante mortem causada por otras micobacteriosis

Del mismo modo que el agente causal de la PTB puede ocasionar interferencias diagnósticas en la detección de animales con TB debido a su similitud antigénica, la infección (o exposición) a otras especies bacterianas del género

Mycobacterium puede dar lugar a un fenómeno similar. Este género engloba un gran número de especies, de entre las cuales solo algunas son consideradas patógenas (como los agentes causales de la TB y de la PTB), siendo muchas otras bacterias saprofitas (que pueden sobrevivir en el medio ambiente nutriéndose de materia orgánica muerta sin infectar otros organismos) o patógenos oportunistas (que normalmente son considerados no patógenos y solo dan lugar a infecciones cuando un hospedador está inmunodeprimido y/o concurren otras circunstancias favorecedoras).

Las micobacterias que dan lugar a reacciones cruzadas en el diagnóstico de la TB pueden clasificarse en dos grupos fundamentales: aquellas de crecimiento rápido (que pueden cultivarse en el laboratorio dando lugar a colonias visibles en menos de siete días) y las de crecimiento lento (que tardan más de siete días en producir colonias visibles en medio sólido). Las micobacterias de crecimiento rápido son normalmente especies saprofitas de vida libre ampliamente distribuidas en el medio ambiente, por lo que con frecuencia son denominadas micobacterias ambientales (o atípicas), mientras que las de crecimiento lento son normalmente especies patógenas oportunistas (o patógenos estrictos como los miembros del MTBC).

Independientemente del grupo al que pertenezca la micobacteria que pueda estar dando lugar a un problema de interferencia diagnóstica en un rebaño, ésta tiene lugar por el hecho de que algunas de las proteínas existentes en la PPD bovina se encuentran también presentes en estas otras micobacterias (Aagaard et al., 2010). La infección por estos microorganismos se traduciría, por tanto, en un descenso de la Sp de las pruebas basadas en la PPD como la IDTB y el IGRA, ya que aumenta la probabilidad de aparición de reacciones inespecíficas en animales sanos. A ello se añade el hecho de que la infección por micobacterias no tuberculosas (y otros microorganismos, como *Rhodococcus equi*) puede, en ocasiones, dar lugar a la aparición de lesiones compatibles con la TB que pueden ser detectadas en el matadero y, excepcionalmente, incluso confundidas con casos de TB al aplicar técnicas de histopatología (Varello et al., 2008). Del mismo modo, pueden dar lugar a reacciones cruzadas en algunas pruebas moleculares dirigidas a fragmentos de ADN propios del MTBC usadas en el pasado (Ford et al., 1993), si bien dichas técnicas son ahora mucho más específicas.

Las especies de micobacterias no tuberculosas más frecuentemente mencionadas en el caso de problemas diagnósticos en países con programas de erradicación o vigilancia de TB bovina basados en el uso de técnicas *ante* y *post mortem* han sido sin duda las integrantes del complejo MAC, en el que, además de MAP, se encuentran otras subespecies de *M. avium*, como *M. avium* subsp. *avium* (MAA) y *M. avium* subsp. *hominissuis* (MAH), además de otras

especies menos frecuentes en animales (como *M. intracellulare* o *M. chimaera*) (Turenne et al., 2007). MAA es el agente causal de la tradicionalmente llamada TB aviar (o micobacteriosis aviar), pero ha sido aislado de muchas especies de mamíferos, incluyendo el ganado bovino, el ovino, el ciervo, el jabalí y el tejón (Muñoz-Mendoza et al., 2013). MAH, a su vez, es una subespecie de reciente definición con una distribución ambiental mucho más amplia, siendo con frecuencia el propio ambiente la fuente de infección para los animales e incluso los hombres. MAH es considerada, no obstante, saprofita, y tiene por tanto una patogenicidad mucho menor que MAA (o MAP), teniendo un interés clínico más reducido en medicina veterinaria ya que no suele dar lugar a enfermedad clínica, excepto en el ganado porcino, donde puede dar lugar a lesiones granulomatosas localizadas en nódulos linfáticos situados en la cabeza y en el intestino (Thorel et al., 1997, 2001; Álvarez et al., 2011), que pueden confundirse con lesiones tuberculosas (causadas por miembros del MTBC). El ganado bovino parece naturalmente resistente a la infección por MAH, si bien esta bacteria se ha aislado de muestras de vacas, y muy ocasionalmente en casos de animales con lesiones (Thorel et al., 1997). A pesar, por tanto, de la limitada importancia clínica de MAA o MAH en el ganado bovino ambos microorganismos pueden ser relevantes en el caso del diagnóstico de TB por su capacidad para afectar tanto a la Se como a la Sp de las pruebas de diagnóstico de la TB bovina, pudiendo comprometer así el éxito de los planes de erradicación (Lauzi et al., 2000; Waters et al., 2004a; Dunn et al., 2005). Por este motivo, los antígenos utilizados en las pruebas diagnósticas basadas en la comparación de la respuesta frente a la PPD bovina con la obtenida frente a otros antígenos (como la IDTBc) utilizados en rebaños libres de TB se basan normalmente en el uso de la PPD aviar, obtenida a partir de una cepa de MAA, perteneciente al MAC y relacionada, por tanto, con MAH.

No obstante, otras micobacterias, como *M. fortuitum* (Michel, 2008), *M. non-chromogenicum* (Hughes et al., 1993; McCorry et al., 2004) o *M. kansasii* han sido también aisladas de muestras de bovino, en ocasiones con resultados positivos en pruebas de diagnóstico *in vivo* y *post mortem* (por ejemplo, técnicas moleculares), como en el caso de *M. kansasii* (Hughes et al., 2005; Vordermeier et al., 2007). En este caso, el uso de técnicas basadas en la inoculación simultánea de PPD aviar puede tener un efecto positivo más reducido en la optimización de la Sp, dado que estas otras micobacterias no tuberculosas pueden no reaccionar frente a los antígenos extraídos de una cepa de MAA (o reaccionar de manera similar frente a la PPD aviar y la PPD bovina) (Jenkins et al., 2018). Por este motivo, en Sudáfrica, donde se identificó *M. fortuitum* como una fuente relevante de reacciones inespecíficas en las pruebas diagnósticas de la TB en búfalos, se han utilizado antígenos extraídos de cepas de esta especie al realizar la prueba IGRA (además de la PPD bovina tradicional) (Michel, 2008; Michel et al., 2011).

La mayor parte de las veces, no obstante, puede no llegarse a identificar la micobacteria causante de las reacciones inespecíficas, si bien puede sospecharse de su existencia por presentarse patrones marcados en su aparición (como una determinada localización geográfica o estacionalidad) (Gormley et al., 2013) o por la detección de ciertos factores de riesgo que podrían favorecer la sensibilización del ganado a micobacterias no tuberculosas, como la presencia muy abundante de aves que puedan interactuar con el ganado o contaminar su alimentación, particularmente cuando se utilizan mezcladoras que podrían incrementar el alcance de la contaminación y afectar a un número superior de animales (Lauzi et al., 2000).

Interferencia causada por la vacunación frente a tuberculosis y paratuberculosis

La vacunación frente a la TB en bovinos está prohibida en países de la UE con programas de erradicación (Directiva 78/52/CEE). Esta prohibición se debe a la interferencia que provocan las vacunas actuales con las pruebas oficiales de diagnóstico de TB. Actualmente, solo existe una vacuna comercializada en humanos, el bacilo de Calmette-Guérin o BCG. Esta vacuna proviene de una cepa de *M. bovis* aislada de una mastitis tuberculosa de un bovino, la cual se atenuó mediante múltiples sub-cultivos entre los años 1908 y 1921. Existen numerosas publicaciones que han evaluado la respuesta inmune producida por la BCG y su eficacia en estudios experimentales en ganado bovino, resultados que han sido complementados en los últimos años con estudios llevados a cabo en otras especies domésticas como la cabra y la oveja (Balseiro et al., 2017; Buddle et al., 2018). También se ha estudiado su eficacia en fauna silvestre, destacando los estudios en tejones en Reino Unido, donde existe licencia para su administración intramuscular (Robinson et al., 2012), en jabalíes en la Península Ibérica (Beltrán-Beck et al., 2012) y en zarigüeyas en Nueva Zelanda (Buddle et al., 2018). Como se ha citado previamente, uno de los mayores inconvenientes que presenta la BCG y otras vacunas enteras es que producen reactividad en la técnica de IDTB y en la prueba de IGRA, en las cuales se emplean tradicionalmente PPD bovina y aviar y, en consecuencia, los animales vacunados con BCG son indistinguibles de los infectados. Por este motivo, se vienen desarrollando antígenos específicos del MTBC y ausentes o no excretados por la BCG, también conocidos como antígenos DIVA por sus siglas en inglés (*differentiating infected from vaccinated animals*) (Vordermeier et al., 2016a). Estos antígenos han sido evaluados por separado o en cócteles y como péptidos sintéticos o proteínas recombinantes, tanto en la prueba IGRA como en la IDTB, y en líneas generales, han presentado una elevada Sp en bovinos vacunados con BCG (Vordermeier et al., 2016a). Sin embargo, los primeros cócteles desarrollados, que incluían como antígenos predominantes los péptidos ESAT-6/CFP-10 presentaban una menor Se que las PPD clásicas (Vordermeier et al., 2001). Para solventar este

problema, y gracias al estudio comparativo de los genomas completos de *M. bovis* y *M. bovis* BCG junto con estudios de transcriptómica, se han desarrollado nuevos antígenos potenciales DIVA como el Rv3615c, que detecta animales no detectados por ESAT-6/CFP-10, y, por tanto, puede aumentar la Se (Vordermeier et al., 2016b). Posteriormente, otro estudio identificó, tras evaluar un gran número de antígenos en plasmas de bovinos infectados y vacunados con BCG, las proteínas Rv2346c y Rv3020c como potenciales DIVA para complementar a las anteriormente citadas (Jones et al., 2010). En un trabajo posterior, la Rv3020v no aumentó la Se alcanzada por el cóctel ESAT-6/CFP-10/Rv3615c en la prueba IGRA, aunque sí lo hizo en la IDTB (Jones et al., 2012). Adicionalmente, estos antígenos DIVA también han demostrado ser eficaces en los test serológicos de detección de anticuerpos, como el test Enferplex TB multiantígeno quimioluminescente, obteniendo alta Sp en bovinos vacunados con BCG (Whelan et al., 2010). Sin embargo, actualmente estos péptidos sintéticos o proteínas recombinantes tienen un coste elevado, probablemente inasumible para su uso a gran escala en las pruebas oficiales de diagnóstico en el marco de los programas de erradicación en muchos países.

Si bien la BCG es la vacuna más caracterizada y estudiada en animales, existen otras vacunas que han sido evaluadas como sustitutas de la BCG o como refuerzo de ésta. En el primer caso, recientemente se ha desarrollado una vacuna de *M. bovis* inactivada por calor, que ha demostrado desarrollar inmunidad y ser eficaz en la reducción de la severidad de las lesiones tuberculosas en cabras (Arrieta-Villegas et al., 2018; Roy et al., 2018b) y jabalíes (Díez-Delgado et al., 2016). En cuanto a la respuesta de IFN- γ tras la estimulación con ESAT-6, se ha descrito que puede producir respuestas positivas en bovino cuando se aplica de forma subcutánea pero no por vía oral (Jones et al., 2016), vía esta última que ha demostrado cierta eficacia en la reducción de las lesiones y la carga bacteriana en jabalíes y cerdos (Garrido et al., 2011; Beltrán-Beck et al., 2014a), no así en ovejas (Balseiro et al., 2017).

Otras vacunas y prototipos vacunales destinados a humanos también se han evaluado en grandes animales, principalmente en modelos bovinos y caprinos. La vacuna MTBVAC, construida a partir de una cepa *M. tuberculosis* moderna del linaje 4 que fue atenuada mediante la delección de los genes *phoP* y *fadD26* que codifican importantes factores de virulencia, es la única vacuna española que se postula como sustituta de la BCG en humanos. Esta última vacuna contiene dos de los antígenos DIVA más importantes (ESAT-6 y CFP-10), aunque su excreción está regulada, por lo que se ha observado cierta interferencia en los niveles de IFN- γ en ratones, así como usando el prototipo SO2 en cabras (Bezoz et al., 2015b; Aguilo et al., 2017). Esto dificultaría su uso en animales sometidos a campañas de erradicación, pues habría que desarrollar nuevos antígenos DIVA específicos para esta vacuna. Otras estrategias han ido encaminadas al desarrollo de otras vacunas de *M. bovis* o BCG modificadas genéticamente (Rizzi et al., 2012; Blanco et al., 2013),

o con otro enfoque totalmente distinto, hacia vacunas de subunidades o vectores víricos que expresan distintas proteínas recombinantes y que podrían utilizarse como refuerzo de la BCG, las cuales dependiendo de su composición proteica serían compatibles o no con la estrategia DIVA (Maue et al., 2007; Vordermeier et al., 2009; Pérez de Val et al., 2012b). Por último, otra estrategia distinta enfocada a la TB humana y evaluada experimentalmente en cabras, es la vacunación terapéutica como se propone con la vacuna RUTI, basada en fragmentos bacterianos de *M. tuberculosis* y acompañada de tratamiento antibiótico con isoniazida (Domingo et al., 2009), pero este enfoque no es admisible como estrategia frente a la TB en animales.

La PTB, como ya se ha comentado, es una micobacteriosis causante de una enteritis granulomatosa crónica en rumiantes, con gran repercusión económica y sanitaria en todo el mundo. Sin embargo, gracias a la vacunación se puede prevenir la clínica, y, por ende, reducir las pérdidas productivas que genera (Bastida y Juste, 2011). No obstante, no está permitido su uso en el ganado bovino en países con programas de erradicación de TB debido a la interferencia que causa en las técnicas de diagnóstico. En este sentido, recientemente, un análisis proteómico de una PPD bovina y una PPD aviar comerciales, ha puesto de manifiesto las proteínas compartidas entre ambos derivados proteicos purificados, haciendo evidente las interferencias cruzadas entre el MTBC y el MAC, revelando 146 proteínas comunes (Infantes-Lorenzo et al., 2017). A diferencia del ganado bovino, la vacunación está muy extendida en los pequeños rumiantes. El diagnóstico rutinario de TB en pequeños rumiantes se contempla básicamente para el ganado caprino, cuando convive o tiene relación epidemiológica con el ganado bovino o en todos los casos en aquellas regiones con programas específicos de erradicación de TB caprina, siendo, por tanto, de gran interés el estudio de esta interferencia en esta especie. En lo que respecta a las vacunas frente a MAP comercializadas actualmente, todas son vacunas enteras e inactivadas, como Gudair (CZ Vaccines), Silirum (CZ Vaccines) o Mycopar (Fort Dodge Animal Health) (Park y Yoo, 2016).

La IDTBs es la técnica más afectada por la vacunación frente a MAP, como se apreció en un estudio realizado en terneros vacunados con Gudair, donde la Sp estuvo muy comprometida, pues 6 de 7 animales vacunados presentaron reacciones positivas a las 18 semanas post-vacunación (Coad et al., 2013). Sin embargo, en este estudio, el número de reactores positivos disminuyó a 4 a las 24 semanas, lo que sugiere que esta interferencia podría estar asociada al tiempo post-vacunación. En otro estudio que empleó la vacuna viva Neoparasec, la interferencia en la IDTBs se prolongó dos años (Kohler et al., 2001). Por el contrario, en un estudio realizado recientemente en cabras vacunadas con Gudair a los siete meses de edad, la interferencia en la IDTBs desapareció entre los nueve y los doce meses post-vacunación (Roy et al., 2018a). Con objeto de aumentar la Sp de la IDTBs y mejorar la Se de la IDTBc, un artículo reciente propuso emplear nuevos criterios

de interpretación relativos a la primera medición en lugar de valores absolutos en milímetros, consiguiendo así una Se y Sp del 100% en ambas pruebas bajo condiciones experimentales (Serrano et al., 2017). Dos estudios realizados en Nueva Zelanda también describieron esta interferencia en la IDTBs y en los test serológicos realizados en ciervos libres de TB y criados en granja (Mackintosh et al., 2005; Stringer et al., 2011). La IDTBc, sin embargo, demostró ser una prueba muy específica en animales vacunados, tanto en bovino como en caprino (Garrido et al., 2013; Roy et al., 2018a). No obstante, en animales vacunados frente a PTB e infectados de TB, la Se de la IDTBc puede verse afectada debido a una mayor respuesta a la PPD aviar que enmascare la reacción a la PPD bovina, como se ha descrito en bovinos y caprinos (Pérez de Val et al., 2012a; Serrano et al., 2017). Por otro lado, la prueba del IFN- γ ha demostrado ser más robusta en términos de Sp en ganado bovino (Coad et al., 2013) y caprino (Chartier et al., 2012) vacunados frente a MAP, obteniendo en esta última especie, una Sp mayor o igual al 97% en un estudio que empleó una cohorte de 99 animales, varios puntos de corte y que evaluó distintos tiempos post-vacunación (Roy et al., 2018a).

En lo relativo a los test serológicos disponibles utilizados en el diagnóstico de la TB, el test de Enferplex para caprinos que emplea distintas proteínas recombinantes (MPB70, MPB83, ESAT-6 y CFP-10), PPD bovina y el péptido sintético MPB70, obtuvo una Sp óptima en un estudio llevado a cabo en animales vacunados de PTB procedentes de un país libre de TB como Noruega (O'Brien et al., 2017). Sin embargo, en el test de IDEXX que emplea MPB70 y MPB73, se observó una pérdida de Sp en animales vacunados y tuberculinizados después de la vacunación con PPD bovina y aviar en bovino y caprino, sugiriendo un posible efecto de potenciación de la respuesta inmune humoral (booster) producido por las PPD tras la vacunación de PTB (Coad et al., 2013; Roy et al., 2018a).

El empleo de antígenos DIVA específicos de *M. bovis* como los antígenos ESAT-6, CFP-10 y Rv3615c, demostró ser una buena estrategia también para diferenciar animales vacunados frente a PTB de infectados con TB en bovino (Coad et al., 2013; Serrano et al., 2017) y caprino (Pérez de Val et al., 2012a).

Otras causas de interferencias: fraudes

De acuerdo con el diccionario de la Real Academia Española, "fraude" (del latín *fraus, fraudis*) en su primera acepción se define como "Una acción contraria a la verdad y a la rectitud, que perjudica a la persona contra quien se comete". De hecho, desde el punto de vista de la administración, ya que se trata de una prueba oficial de TB en ganado bovino, se considera un delito tal y como se recoge en derecho: "Delito que comete el encargado de vigilar la ejecución de contratos públicos, o de algunos privados, confabulándose con la representación de los intereses opuestos".

Aplicándose al tema que nos ocupa se considera fraude cuando se pretende falsear el resultado de las pruebas de diagnóstico oficial de la TB bovina en el contexto del plan de erradicación (Figura 25A). En el presente apartado nos centraremos en los fraudes en la IDTB, los cuales están algo más caracterizados, y cuyo resultado puede verse afectado por reacciones cruzadas o adversas originadas por distintos motivos. Así, puede existir una reacción de hipersensibilidad a los componentes inoculados (Gershwin, 2018), interferencias con micobacterias no tuberculosas (Altet Gómez, 2009) e incluso se pueden producir reacciones inespecíficas en la piel debido al uso de determinadas agujas, a la incorrecta inoculación, a una tuberculina en mal estado, a repeticiones de test, etc. obteniéndose falsos positivos (Díez-Guerrier et al., 2018). En el caso de las interferencias por micobacterias atípicas, el avance en nuevas técnicas moleculares diagnósticas ha permitido identificar micobacterias no tuberculosas responsables de reacciones inespecíficas. No obstante, este tipo de reacciones no se considerarían fraude, al igual que los falsos negativos en animales infectados cuando éstos se encuentran en fase anérgica: animales que normalmente presentan un estado avanzado de la enfermedad (animal inmunocomprometido) sin capacidad de reacción frente a la prueba IDTB debido a un agotamiento de su sistema inmune.

Dentro de estas reacciones anómalas, se podrían incluir los fraudes en la IDTB como falsos positivos o negativos debido a la aplicación de sustancias exógenas que desvirtúan la prueba y, por tanto, dificultan el plan de erradicación de la TB bovina. Este es un problema que se plantea desde hace relativamente poco tiempo en España y donde apenas hay información al respecto, pero que ya es viejo en otros países como el Reino Unido, donde sí se han denunciado algunos casos desde el año 2011. DEFRA (Gobierno del Reino Unido) anunció que tenía evidencias de que algunos ganaderos de bovino del sur y oeste de Inglaterra y de las Midlands habían intercambiado de forma ilegal crotales de las orejas, reteniendo a animales tuberculosos positivos altamente productores en la granja, mientras que enviaban animales menos productivos al matadero en su lugar. Por esta razón, el Departamento de Medio Ambiente del Reino Unido con el fin de combatir los fraudes por cambio de crotal, exigió a los veterinarios una toma de muestra de ADN (fragmento de una oreja) de todos los animales que fueran positivos a TB (DEFRA, 2011). Así, cuando los animales eran enviados al matadero, previamente eran de nuevo crotalados y, a la vez, se retiraba una pequeña muestra cuyo ADN era testado por un laboratorio de Sanidad Animal, cuyos resultados podían ser cruzados de forma aleatoria o cuando hubiera una sospecha de fraude al contrastar el ADN tomado en la granja y en el matadero.

Actualmente el fraude en la TB bovina en el Reino Unido está aumentando de forma exponencial, hasta tal punto que supone, de acuerdo con algunos veterinarios de la administración, no solo una pérdida de dinero público, sino que

existe el riesgo de manchar la reputación de la comunidad ganadera (Logan, 2018). La prueba cutánea utilizada para identificar la TB bovina requiere a un veterinario que inocular antígenos (PPD) en la piel del animal y realiza la lectura 72 h después para verificar la existencia de una reacción intradérmica (Figura 25A). Durante el año 2019 en el Reino Unido, han sido denunciadas actividades fraudulentas por modificar los resultados de la IDTB, dándose a conocer algunas sentencias en las que se les imponía una multa, e incluso penas de cárcel, por la aplicación fraudulenta de arena, líquido de estiércol y otras sustancias potencialmente perjudiciales en los animales, e incluso induciendo falsos positivos al causar hematomas en la piel del animal en el área inyectada (Black, 2018; Riegel, 2019; https://www.bovinetb.co.uk/article_print.php?article_id=110). Hay que remarcar que en el Reino Unido las compensaciones económicas por el sacrificio de los animales reactivos pueden ser muy elevadas, cubriendo en la mayor parte de los casos el valor total del animal.

En España, aunque no hay bibliografía o sentencias disponibles que describan estas situaciones, desgraciadamente, en nuestra experiencia, existen numerosas ocasiones en las que se sospecha de la administración de sustancias que modifican el resultado de la prueba de IDTB para el diagnóstico de la TB bovina, pero en muy pocas se ha podido comprobar de qué sustancia se trataba, como es el caso de la aplicación de aguarrás (esencia de trementina). Con el fin de modificar la respuesta de la IDTB, también se ha sospechado de la administración de inmunomoduladores (corticoides) con efecto retardado de forma sistémica e incluso en forma de pomadas de aplicación tópica para inducir falsos negativos, ya que estos reducen la respuesta inflamatoria (Figuras 25C y 25D – Respuesta histológica normal sin modificar IDTB). Por el contrario, en algunas ocasiones se puede observar que, tras la aplicación de la PPD bovina o aviar, aparece en el punto de inoculación una reacción exagerada (Figura 25E), que nada tiene que ver con el incremento de grosor de la piel de los animales infectados de TB. El punto de inoculación adquiere un gran tamaño y cuando se observa macroscópicamente se aprecian amplias zonas de necrosis del tejido subcutáneo, del panículo adiposo e incluso del tejido muscular, asociado con áreas de edema y hemorragias. Esta imagen es muy diferente del nódulo de diferente tamaño que aparece en la prueba IDTB (Figura 25B) y que, histológicamente, se caracteriza por una lesión focal bien delimitada no encapsulada (Figura 25C), que a grandes aumentos está principalmente integrada por numerosos histiocitos, macrófagos activados y linfocitos (Figura 25D). La denuncia de algunos casos por parte de los veterinarios oficiales, junto con la colaboración de los laboratorios de referencia con la aplicación de estudios histopatológicos y toxicológicos, están arrojando mucha luz sobre algunos de estos fraudes. No obstante, se necesita la colaboración de todos los interlocutores (ganaderos, administración, veterinarios y laboratorios) para erradicar este tipo de actuaciones.

Esta adulteración de la prueba de IDTB empleada para el diagnóstico de la TB bovina, en claro ascenso, supone según McGuckian, veterinario oficial del Departamento de Agricultura de Irlanda del Norte, una actuación “moralmente errónea”, ya que los involucrados en esta práctica que fuerzan los falsos positivos empañan la imagen de los veterinarios y ganaderos y de las técnicas diagnósticas, aumentan el coste de los programas e impactan negativamente en el control de la TB bovina, con las consiguientes repercusiones en sanidad animal y en salud pública (<https://www.bbc.com/news/uk-northern-ireland-45744229>).

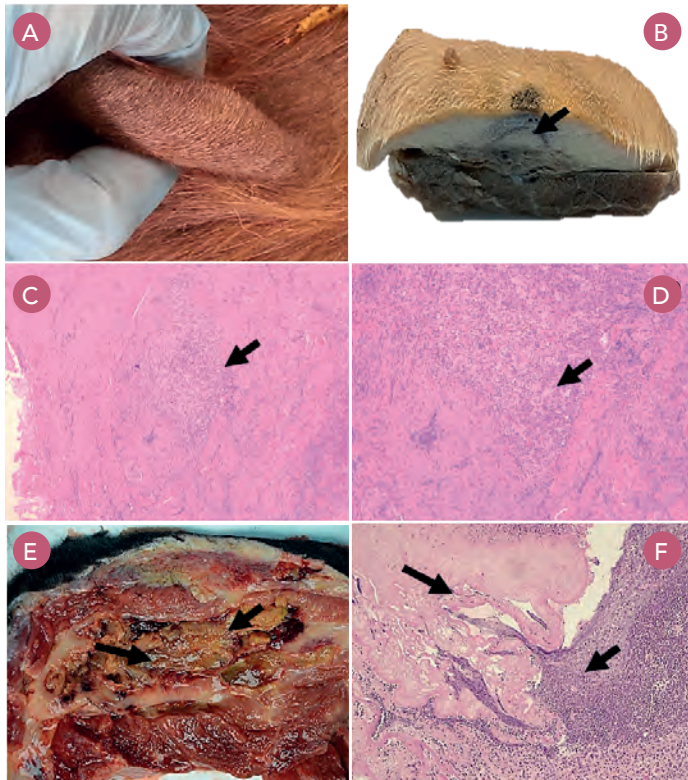


Figura 25. Prueba de la intradermoreacción (IDTB).

A) Prueba positiva a la intradermoreacción de tuberculina (PPD) bovina (igual o superior a 5 mm de diámetro). B) Nódulo subcutáneo que se produce debido a la inyección de tuberculina bovina (flecha). C) Reacción inflamatoria bien localizada pero no encapsulada.

Tinción de hematoxilina-eosina (flecha). 4x. D) El proceso inflamatorio se caracteriza principalmente por la presencia de numerosos histiocitos y macrófagos activados (flecha) con citoplasma vacuolizado, además de abundantes linfocitos y algunos neutrófilos.

Tinción de hematoxilina-eosina. 10x. E) Lesión macroscópica en el punto de inoculación de la IDTB con amplias cavidades necróticas de la dermis profunda y panículo adiposo (flechas), con marcado edema asociado debido a la inoculación fraudulenta de aguarrás.

F) Histopatológicamente se trata de una dermatitis profunda y paniculitis necrotizante donde destaca un intenso proceso supurativo asociado con amplias zonas de necrosis y edema en dichas áreas. Tinción de hematoxilina-eosina. 4x.

4.2.4. Serología en especies domésticas y silvestres

José Antonio Infantes-Lorenzo, Inmaculada Moreno, Jobin Thomas, M^o Ángeles Risalde

El diagnóstico es una parte esencial en la vigilancia de la TB, así como un paso crucial para el éxito de los programas de control y erradicación de la enfermedad. Idealmente, un test diagnóstico debería ser fácil de aplicar e interpretar, ser relativamente económico y tener una elevada Se y Sp.

Los test inmunológicos para la detección de TB animal son un pilar fundamental en lo que respecta a los programas de vigilancia, control y lucha frente a esta enfermedad. En este sentido, los test diagnósticos basados en la respuesta inmune humoral han emergido como una herramienta adicional para mejorar la detección de animales infectados y/o enfermos. Estas técnicas consisten en la detección de anticuerpos frente a diferentes antígenos específicos del MTBC en suero, plasma o leche. Las ventajas de estos test con respecto a aquellos de base celular son su bajo coste económico y que el análisis puede realizarse tanto *ante mortem* como *post mortem* en un gran número de muestras simultáneamente. Además, tienen otras ventajas logísticas ya que solamente requieren manipular una vez los animales y no necesitan un procesado rápido de las muestras, al contrario que la IDTB y el test de detección de IFN- γ , respectivamente.

Principales antígenos utilizados en técnicas serológicas

La determinación de la respuesta serológica varía en función de los antígenos utilizados. Diversos estudios consideran que se debe utilizar más de una proteína en el serodiagnóstico de TB, ya que actúan de forma complementaria aumentando la Se de la técnica (Souza et al., 2012; O'Brien et al., 2017). Los antígenos más comúnmente utilizados en el serodiagnóstico de la TB son:

- **Derivado proteico purificado bovino (Purified Protein Derivative: PPD bovina):** también conocido como tuberculina bovina. La PPD bovina es un extracto de proteínas obtenido a partir de cultivos inactivados de *M. bovis* en medios sintéticos. Se compone principalmente de proteínas (93%) aunque también está formada por polisacáridos y ácidos nucleicos. La naturaleza del producto y los propios procesos de producción hacen que su composición final sea variable y, por consiguiente, su estandarización sea compleja. Se utiliza como *standard* en el diagnóstico de la TB (Cousins y Florisson, 2005).
- **Diana antigénica secretora temprana de 6 kDa (ESAT-6):** ésta es una proteína secretada en las fases iniciales de la infección por MTBC (Brodin

et al., 2006). Está ausente en *M. bovis* BCG (Bacillus Calmette-Guérin) así como en el 90% de micobacterias que no pertenecen al MTBC o al MAC (Chambers, 2013). Esta proteína se usa normalmente para el diagnóstico en conjunto con la proteína CFP-10. ESAT-6 es capaz de inducir respuestas inmunes celulares (Moradi et al., 2015) y humorales (Leng et al., 2014).

- **Proteína 10 del filtrado de cultivo (CFP-10):** esta proteína de 10 kDa está ausente en la BCG y se puede utilizar tanto en pruebas basadas en la respuesta inmune celular (Araújo et al., 2014a) como en las basadas en la humoral (Zhu et al., 2014).
- **Proteína de movilidad de *M. bovis* 83 (MPB83):** ésta es una lipoproteína glicosilada de la membrana de la micobacteria (Waters et al., 2006). Se produce en grandes cantidades en *M. bovis* (Lyashchenko et al., 2001) y en *M. bovis* BCG (Wiker, 2009). Su potencial diagnóstico en test serológicos ha sido ampliamente demostrado (Chambers, 2013).
- **Proteína de movilidad de *M. bovis* 70 (MPB70):** esta proteína soluble es secretada en grandes cantidades en infecciones por *M. bovis* (Lyashchenko et al., 2001) y también está presente en *M. bovis* BCG (Wiker, 2009). Constituye un importante antígeno en tests serológicos junto a MPB83, ya que son proteínas expresadas exclusivamente por micobacterias del MTBC y además son altamente inmunogénicas (Wiker, 2009). Esto hace que estas proteínas sean candidatas para usarse como reactivos para la diferenciación de animales infectados o vacunados con PTB (DIVA, *Differentiation of Infected and Vaccinated Animals*).
- **Complejo multiproteico P22:** este complejo proteico se obtiene a partir de la PPD bovina mediante cromatografía de afinidad y contiene las principales proteínas inmunogénicas (MPB70, MPB83, ESAT-6 y CFP-10). Es un antígeno altamente específico usado en pruebas de serodiagnóstico en diversas especies animales domésticas y silvestres (Casal et al., 2017; Infantes-Lorenzo et al., 2019a, 2019b, 2020; Thomas et al., 2019a, 2019b).

Técnicas utilizadas para el diagnóstico serológico de la tuberculosis

Actualmente existe una amplia diversidad de formatos de pruebas de base humoral disponibles para el diagnóstico de la TB. Los principales test para la evaluación de la inmunidad humoral frente a la TB animal se desarrollan a continuación:

Ensayo inmunoenzimático (ELISA)

El ELISA indirecto es la técnica serodiagnóstica más ampliamente utilizada para detectar anticuerpos circulantes frente al MTBC. Los anticuerpos, una vez unidos a un antígeno inmovilizado, se detectan mediante un anti-anticuerpo unido a una enzima capaz de generar una reacción cuantificable mediante un cambio de color (Figura 26). El antígeno más empleado en ELISA es la PPD bovina, aunque muchos otros antígenos purificados o específicos han sido testados para mejorar la precisión diagnóstica en animales. El uso de cócteles de antígenos (MPB83, MPB70, P22), el extracto etanólico de antígeno de *M. bovis* (EVELISA) y la preabsorción de anticuerpos frente a MAP o frente a otras micobacterias ambientales como *M. phlei* han mostrado resultados prometedores (Wadhwa et al., 2013).

Actualmente existe un nuevo formato denominado ELISA de doble reconocimiento (DR-ELISA) que detecta anticuerpos frente a MPB83. La novedad es que el antígeno está presente en la placa y en el conjugado, y permite reconocer otras inmunoglobulinas diferentes a la IgG, como la IgM, lo que le permite detectar infecciones recientes (Venteo et al., 2012).

Ensayo de polarización de fluorescencia (FPA)

Este test implica el uso de la diana antigénica MPB70 unida a una molécula fluorescente con el fin de detectar anticuerpos frente a la misma en suero. Este método fue descrito inicialmente en terneros y más tarde validado en ciervo (Surujballi et al., 2009) y en alce (Shury et al., 2014), aunque con un valor diagnóstico comparativamente menor.

Test de flujo lateral

Son sistemas basados en técnicas de inmunocromatografía (Lateral-flow assays, también denominados rapid test-RT), empleados para el diagnóstico de TB en distintas especies domésticas y silvestres, que han ofrecido una Se muy variable en función de la especie analizada (Greenwald et al., 2009) (Figura 26). Los principales test diagnósticos son:

- *TB STAT PAK para cérvidos* (Chembio Diagnostic Systems, Inc., Medford, NY). Esta técnica diagnóstica emplea un cóctel antigénico con MPB83, ESAT-6 y CFP-10 (Lyashchenko et al., 2008). Entre sus ventajas se incluyen la facilidad para llevarse a cabo en el campo con un pequeño volumen de sangre, plasma o suero, y la detección de inmunoglobulinas A (IgA), IgM e IgG frente al MTBC (Gowtage-Sequeira et al., 2009).
- *Test DPP* (Chembio Diagnostic Systems, Inc., Medford, NY). Este ensayo ha sido validado en diferentes especies de cérvidos, elefantes y suidos.

Implica la administración de la muestra a testar y el conjugado para detectar anticuerpos (proteína A/G híbrida conjugada a partículas coloidales de oro) en una tira membranosa que contiene los antígenos MPB83 y CFP-10/ESAT-6 (Greenwald et al., 2009). Otro test basado en esta tecnología es el DPP WTB, el cual usa por separado MPB83 y MPB70, y está enfocado principalmente al diagnóstico en suidos (Che'Amat et al., 2015).

- *Test DPP VetTB* (Chembio Diagnostic Systems, Inc., Medford, NY). Este ensayo utiliza como antígenos MPB83 y CFP-10/ESAT-6, así como un anticuerpo anti-IgG como conjugado, dando como resultado una alta Se y Sp (Miller et al., 2019).
- *INgezim TB-CROM* (INGENASA S.A., Madrid, España). Este test emplea el antígeno MPB83 y es muy utilizado para suidos, donde se observó una Se similar o superior y una Sp ligeramente inferior a otros ELISAs caseros o comerciales (Cardoso-Toset et al., 2017; Fresco-Taboada et al., 2019).

Inmunoensayo de impresión multiantígeno (MAPIA)

Esta técnica emplea un panel de 12 antígenos de micobacterias, incluyendo 8 proteínas recombinantes purificadas (ESAT-6, CFP-10, MPB64, MPB59, MPB70, MPB83, Acr1 y la proteína de 38 kDa), dos proteínas de fusión (CFP-10/ESAT-6 y Acr1/MPB83) y dos antígenos nativos, PPD bovina y filtrado de cultivo de *M. bovis* (Lyashchenko et al., 2000). El ensayo permite la identificación de proteínas inmunodominantes específicas de especie, así como patrones de reactividad a lo largo del curso de la enfermedad. El MAPIA presenta una buena Se y Sp en diferentes especies domésticas y silvestres, donde MPB83 solo o en combinación con la proteína Acr1 fueron los antígenos más dominantes (Lyashchenko et al., 2008). Sin embargo, es difícil implementar este análisis a un amplio número de muestras.

Inmunoblot

Los ensayos de electroforesis e inmunoblot suelen llevarse a cabo utilizando antígenos de células enteras sonicadas o MPB83 recombinante, pero no se emplean rutinariamente en el diagnóstico.



Figura 26. Técnicas para el diagnóstico serológico de tuberculosis.
A) Ensayo inmunoenzimático (ELISA). B) Test de flujo lateral (test rápido).

Rendimiento de las técnicas serológicas en animales domésticos y silvestres

Animales domésticos

El ELISA indirecto es el test más usado para el serodiagnóstico de la TB en rumiantes. Estas pruebas presentan una Se muy variable, entre el 18% y el 93,1%, dependiendo del antígeno utilizado (Whelan et al., 2008; Waters et al., 2011a; Bezos et al., 2018), mientras que la Sp generalmente está por encima del 90% (Whelan et al., 2008; Waters et al., 2011a; Casal et al., 2014; McCallan et al., 2017; Infantes-Lorenzo et al., 2019b).

En el ganado bovino, sujeto a programas de erradicación, las técnicas serológicas constituyen una herramienta adicional no oficial para el diagnóstico de la TB. En esta especie, los anticuerpos circulantes se generan principalmente frente a las proteínas inmunodominantes MPB70 y MPB83 (Waters et al., 2011a, 2011b). Aunque se han desarrollado un gran número de ELISAs para el diagnóstico de

la TB, el único autorizado actualmente en los programas de erradicación es el ELISA *M. bovis* Ab Test™ comercializado por IDEXX Laboratories Inc. (Westbrook, Estados Unidos), el cual detecta anticuerpos frente a MPB70 y MPB83 (Waters et al., 2011a). Otros estudios han utilizado proteínas quiméricas formadas mediante la combinación de diferentes antígenos, dando lugar a una Se y Sp por encima del 65% y del 95%, respectivamente (Liu et al., 2007; Souza et al., 2012).

Los trabajos enfocados en el diagnóstico serológico de la TB en caprino muestran una gran variabilidad en las técnicas utilizadas, siendo los ELISAs indirectos los más estudiados. Una de las principales interferencias en el diagnóstico en esta especie es la vacunación rutinaria frente a MAP, que impacta negativamente en la Sp de las técnicas serológicas, debido a antígenos compartidos entre las especies incluidas dentro del MTBC y MAC (Cho et al., 2015; Infantes-Lorenzo et al., 2017). Por ello, para tapizar las placas de ELISA se buscan antígenos presentes en el MTBC y ausentes en micobacterias no tuberculosas. Así, los antígenos más utilizados son MPB70 (Harboe et al., 1990; Acosta et al., 2000; Marassi et al., 2009), MPB83 (Di Blasio et al., 2017), P22 (Bezoz et al., 2018; Roy et al., 2018a) y ESAT-6 y/o CFP-10 (Zanardi et al., 2013). La Se descrita para estas técnicas se encuentra entre el 16% y el 100% en función del antígeno utilizado, de si la muestra se ha recogido antes o después de la IDTB y del *gold standard* utilizado, siendo los antígenos MPB70 y P22 los más sensibles (93,8% y 83,2% respectivamente, pudiendo llegar al 100% al emplear el efecto booster) (Bezoz et al., 2018). Por su parte, la serología ha mostrado un buen rendimiento en términos de Sp, con unos resultados entre el 90% y el 100%, incluso en rebaños vacunados frente a MAP (O'Brien et al., 2017; Infantes-Lorenzo et al., 2019b; Roy et al., 2020).

En ovejas existen muy pocos estudios sobre el serodiagnóstico de la TB, destacando un ELISA para la detección de anticuerpos específicos frente a PPD bovina con una Se del 100% y una Sp variable entre el 37% y el 50%, dependiendo de las interferencias con micobacterias ambientales (Muñoz-Mendoza et al., 2016). Además, se ha desarrollado un ELISA basado en el complejo proteico P22 que ha mostrado una Se similar a la descrita anteriormente y una Sp del 98%, incluso en rebaños infectados con MAP (Infantes-Lorenzo et al., 2020) o *Corynebacterium pseudotuberculosis* (Infantes-Lorenzo et al., 2019b).

Las técnicas serológicas más utilizadas para el diagnóstico de la TB en cerdos domésticos son el ELISA y los test rápidos de flujo lateral, donde la PPD bovina y el MPB83 son los antígenos más utilizados. Diversos estudios han mostrado una Se entre el 72,9% y el 86,4%, así como una excelente Sp del 98,9-100% (Cardoso-Toset et al., 2017; Thomas et al., 2019a). En estas especies, donde la posibilidad de tener interferencia diagnóstica con MAP es menor, la PPD bovina es ampliamente utilizada sin que se observe una reducción de la Sp (Cardoso-Toset et al., 2017; Thomas et al., 2019a).

Animales silvestres

El diagnóstico basado en anticuerpos es sin duda la técnica de diagnóstico más utilizada en jabalíes y cerdos silvestres, debido a su facilidad de uso y a su buen rendimiento en general (Boadella et al., 2011; Pedersen et al., 2017). El antígeno más utilizado es la PPD bovina, presentando una Se del 72,6% al 100% y una Sp del 79% al 100% (Aurtenetxe et al., 2008; Pérez de Val et al., 2017). Sin embargo, estudios recientes se han centrado en mejorar su Sp mediante el uso de antígenos más específicos, como MPB83 (García-Bocanegra et al., 2012; Pérez de Val et al., 2017), MPB70 (Cardoso-Toset et al., 2017), P22 (Thomas et al., 2019a, 2019b) o CFP-10/ESAT-6 (Miller et al., 2019). Los ensayos de flujo lateral basados en MPB83 mostraron valores de Se y Sp del 83% y del 97%, respectivamente (Fresco-Taboada et al., 2019); mientras que el test DPP VetTB presentó una Se del 76,6% y una Sp del 97,3% (Lyashchenko et al., 2008).

Las técnicas de detección de anticuerpos como el ELISA y pruebas inmunocromatográficas rápidas pueden ser útiles como métodos alternativos o pruebas paralelas para el diagnóstico de la TB de base celular en cérvidos (Waters et al., 2011c; Che'Amat et al., 2016a). En estas especies, el uso de antígenos específicos como MPB70, MPB83, ESAT-6 y CFP-10 han demostrado valores de Se y Sp muy variables, los cuales se encuentran entre el 40-91% y el 79-100%, respectivamente (Waters et al., 2011c; Shury et al., 2014; Kang et al., 2016).

En el caso de los tejones, solo existen tres técnicas disponibles para el serodiagnóstico de la TB: el DPP VetTB con una Se del 55% (comunicación personal, Sandrine Lesellier), el inmunoensayo quimioluminiscente múltiple de Enfer Scientific con una Se del 25,7% (Aznar et al., 2014) y el ELISA P22 con una Se de entre el 74% y el 80%, según la prevalencia de TB del área estudiada (Infantes-Lorenzo et al., 2019a). Respecto a la Sp, las dos primeras pruebas mostraron una Sp del 100% mientras que la Sp del ELISA P22 varió entre el 89% y el 96% en función de la prevalencia de TB de la zona de estudio.

Factores relacionados con el rendimiento de las técnicas

La respuesta inmune humoral es muy irregular y los resultados obtenidos en las pruebas serológicas pueden estar condicionados por diferentes factores relacionados con el hospedador, el ambiente, el muestreo y la técnica diagnóstica empleada, de entre los cuales debemos destacar:

Factores del hospedador

Variabilidad genética individual: los resultados de las técnicas serodiagnósticas en cérvidos parecen no verse afectados por variables como la edad o el sexo

(O'Brien et al., 2008). Sin embargo, en jabalí, los rayones infectados tienen menor respuesta en ELISA y DPP en comparación con individuos jóvenes o adultos (Che' Amat et al., 2015; Fresco-Taboada et al., 2019), observándose también variaciones relacionadas con el género (Boadella et al., 2011).

Dosis infectiva: las dosis infectivas altas provocan una moderada respuesta inmunológica mediada por células y una rápida aparición de anticuerpos circulantes frente a *M. bovis*, mientras que dosis bajas provocan una respuesta inmune mediada por células más gradual y una escasa o ausente respuesta de base humoral (Pollock y Neill, 2002).

Etapas de la infección: debido a la evolución natural de la infección en el hospedador, no se detectan anticuerpos en animales infectados hasta las fases más avanzadas de la enfermedad. En estudios experimentales se ha estimado que el título de anticuerpos en animales infectados es detectable entre dos y seis meses tras la infección y puede durar hasta dos años tras la misma (Welsh et al., 2005; Waters et al., 2006).

Factores ambientales

Los resultados de las pruebas serológicas podrían verse afectados por la reactividad cruzada a la presencia estacional de micobacterias ambientales no tuberculosas (Queirós et al., 2012), así como por la vacunación frente a MAP en cabras y ovejas (Muñoz-Mendoza et al., 2016; Roy et al., 2018a).

Factores relativos a una sensibilización previa

La realización de la prueba IDTB antes del análisis de anticuerpos también podría conducir a una alteración de los resultados serológicos, ya que se está produciendo una estimulación antigénica *in vivo*. El incremento del título de anticuerpos específicos circulantes tras la IDTB se conoce como efecto *booster*. En el ganado bovino y caprino, la Se del ELISA para la detección de anticuerpos específicos frente a la PPD completa se incrementa cuando se realiza con muestras recogidas 15 días tras la inoculación de las PPDs (Casal et al., 2014). Por su parte, en animales silvestres, Griffin et al. (1993) describieron que la Se del ELISA se incrementó 10 días después del test de piel en ciervos. De manera similar, en infecciones experimentales con ciervo de cola blanca, reno y ciervo se observó una elevada respuesta de anticuerpos tras la realización de la IDTB (Buddle et al., 2010; Waters et al., 2004b). Sin embargo, en ensayos repetitivos de test de piel comparado en ciervo con un intervalo de 6 meses no se vieron afectados los resultados de los test serológicos (Che' Amat et al., 2016a), por lo que esta variable podría estar condicionada al intervalo de tiempo entre las distintas IDTB.

Factores relacionados con la muestra y el muestreo

La fuente de la muestra también puede causar variaciones en los resultados del test diagnóstico, habiéndose observado que los resultados del test serológico dependen del modo en que se recoja la muestra y de su localización. Así, en animales silvestres, las muestras recogidas por cazadores y veterinarios presentan una mayor concordancia con los resultados del cultivo que las muestras de carcasas con lesiones compatibles con TB (O'Brien et al., 2008). Por otro lado, tanto los ciclos repetidos de congelación-descongelación de los sueros como la hemólisis también pueden afectar a los resultados (Boadella y Gortázar, 2011). Así, la hemólisis disminuye la Se de los ELISA, aunque esto no ocurre con los test rápidos (Boadella y Gortázar, 2011), los cuales están diseñados para usarse incluso con sangre completa.

Factores relacionados con la técnica diagnóstica

La respuesta de base humoral se puede modificar en función del antígeno utilizado para la detección de los anticuerpos. La Se y Sp de un test dependen especialmente del tipo de antígeno usado, estando el empleo de antígenos específicos o purificados relacionado con la mejora de la precisión diagnóstica. Por ejemplo, los anticuerpos específicos frente a MPB83 aparecen entre tres y cuatro semanas tras la infección, por lo que la convierten en una importante candidata como antígeno de diagnóstico en fases tempranas de la enfermedad (Waters et al., 2006, 2011a). Además, el uso de un conjugado específico de especie da lugar a un mejor resultado, por ejemplo, la proteína G en ELISA de jabalí (Che'Amat et al., 2015).

Por otro lado, las pruebas de referencia o *gold standard* utilizadas tienen una importante influencia sobre el valor diagnóstico de las técnicas serológicas. Así, el cultivo de micobacterias ha sido ampliamente utilizado como test *gold standard* en la validación de otras técnicas. Sin embargo, presenta una baja Se y una elevada dependencia del número y la calidad de los tejidos examinados (Chambers, 2013).

Propuestas de diagnóstico

La selección de un test apropiado se basa en muchos factores como la especie a testar, el estadio de la enfermedad, la precisión diagnóstica del test, la viabilidad económica, la facilidad de realizarlo, etc. Además, la combinación de los resultados de dos test diagnósticos puede incrementar la precisión diagnóstica, pudiéndose combinar los resultados de varios test en paralelo o en serie. Así, el testaje en paralelo es un método en el cual dos test de cribado son llevados a cabo al mismo tiempo y los resultados son combinados posteriormente, lo cual resulta en una Se incrementada pero en una Sp disminuida. Todos estos factores deben tenerse en cuenta a la hora de elegir un test diagnóstico para la detección de TB.

En el ganado bovino y caprino que están sometidos a campañas de erradicación, las pruebas de diagnóstico oficiales se basan en inmunidad mediada por células (IDTB y prueba de detección de IFN- γ), por su capacidad de detectar animales infectados recientemente. Sin embargo, hay estudios que destacan la importancia de la serología como herramienta de diagnóstico para mejorar la detección de animales infectados (Casal et al., 2017; Waters et al., 2017; Bezos et al., 2018). La principal ventaja que presentan las pruebas de base humoral es que permiten la detección de animales infectados que no son diagnosticados por la IDTB o el IFN- γ (animales en estado de anergia) (Waters et al., 2017), por lo que al usarse de manera combinada con las pruebas IDTB se incrementa la Se diagnóstica (Waters et al., 2011a; Casal et al., 2014, 2017). Además, su utilidad potencial para el diagnóstico es mayor en situaciones crónicas de TB, ya que en este tipo de explotaciones la respuesta serológica debería predominar en los animales infectados (Welsh et al., 2005). Por otro lado, también se ha descrito que se puede utilizar el efecto *booster* de la IDTB para aumentar la Se de los ELISAs (Waters et al., 2011b); sin embargo, desde un punto de vista logístico, la realización de otro muestreo requiere una nueva visita a la explotación, lo que encarece mucho la técnica y plantea problemas de manejo del ganado adicionales.

En el ganado ovino, la IDTB no presenta valores de Se y Sp adecuados, mientras que en el porcino la gruesa capa de grasa subcutánea dificulta la realización de esta prueba. Teniendo en cuenta que estas especies no están sujetas a campañas de erradicación y que las técnicas serológicas presentan un buen rendimiento cuando han sido evaluadas, éstas se proponen como la metodología diagnóstica posiblemente más adecuada para el diagnóstico de la TB, especialmente en el porcino.

Por último, en la fauna silvestre, las pruebas serológicas se postulan como las técnicas de elección ya que, a nivel de manejo de los animales, los test que detectan la respuesta humoral de los animales infectados son más prácticos que aquellos basados en la respuesta celular, debido a que no es necesario manipular a los animales dos veces como en la IDTB, ni estimular las muestras de sangre como en la prueba de detección de IFN- γ . Además, estas técnicas pueden usarse tanto *ante mortem* como *post mortem*, siendo esta última la metodología más frecuentemente utilizada para el diagnóstico y los estudios epidemiológicos de TB en fauna silvestre. En cérvidos es preferible la combinación de pruebas mediadas por células junto con el serodiagnóstico de la TB, debido a la baja Se y Sp de las primeras en esta especie. En este sentido la combinación de pruebas basadas en la detección de la respuesta inmune celular y humoral en cérvidos permitió la detección de todos los animales confirmados como positivos por cultivo (Jaroso et al., 2010).

4.2.5 Diagnóstico anatomopatológico y vigilancia en mataderos

Enric Vidal, Ana Balseiro, Alberto Marco, Mariano Domingo

La vigilancia de la TB en el matadero consiste en identificar la presencia de lesiones compatibles con esta enfermedad en las canales y/o vísceras de animales sacrificados para el consumo humano.

Desde que se instauró la pasteurización de la leche la TB ya no se considera una enfermedad de transmisión alimentaria, aún cuando es creciente el consumo de productos tradicionales a base de leche cruda. Así pues, la identificación de lesiones tuberculosas en mataderos tiene un enfoque principalmente orientado a la sanidad animal, siendo la salud pública una preocupación relativamente menor. Por este motivo, es importante que los inspectores oficiales en los mataderos, cuya mayor preocupación es la salud pública, tengan clara la importancia de su papel en el control de esta enfermedad.

Función del matadero

La detección de lesiones tuberculosas en el matadero juega un papel clave en los programas de erradicación de la TB, principalmente en los siguientes dos puntos:

Confirmación de sospechas

Aquellos animales con resultados positivos a las pruebas de IDTB deberán ser sacrificados, pero es necesario confirmar la infección para declarar un nuevo brote y poner en marcha las medidas de control pertinentes. Para ello, es esencial la identificación de lesiones tuberculosas, ya que es justamente en estas lesiones dónde se van a encontrar las micobacterias. Es a partir de estas lesiones de donde se obtiene la mejor muestra para realizar con éxito un cultivo microbiológico y poder identificar que se trata de una micobacteria del MTBC. Con este resultado se confirma el resultado positivo a las pruebas diagnósticas en el animal vivo. El cultivo permitirá, además, caracterizar la cepa y obtener información útil para estudios de epidemiología molecular. En otras palabras, ayuda a intentar averiguar de dónde procede el nuevo brote: contacto con rebaños vecinos, contacto con fauna silvestre, entrada de animales infectados, etc.

Cuando en un animal positivo al test cutáneo no se detectan lesiones confirmatorias compatibles en el matadero se deben valorar dos posibles escenarios: 1) o bien se trata de un animal realmente infectado, en el que las lesiones no se detectan por ser muy pequeñas o debido a una inspección *post mortem*

insuficientemente detallada (no se inspeccionan todos los nódulos linfáticos); 2) o bien se trata de un falso positivo, es decir, un animal no infectado que reacciona a la prueba de diagnóstico por otros motivos, por ejemplo por reacción inmunológica cruzada con otras micobacterias (de la Rua-Domenech et al., 2006). Ver Figura 27.

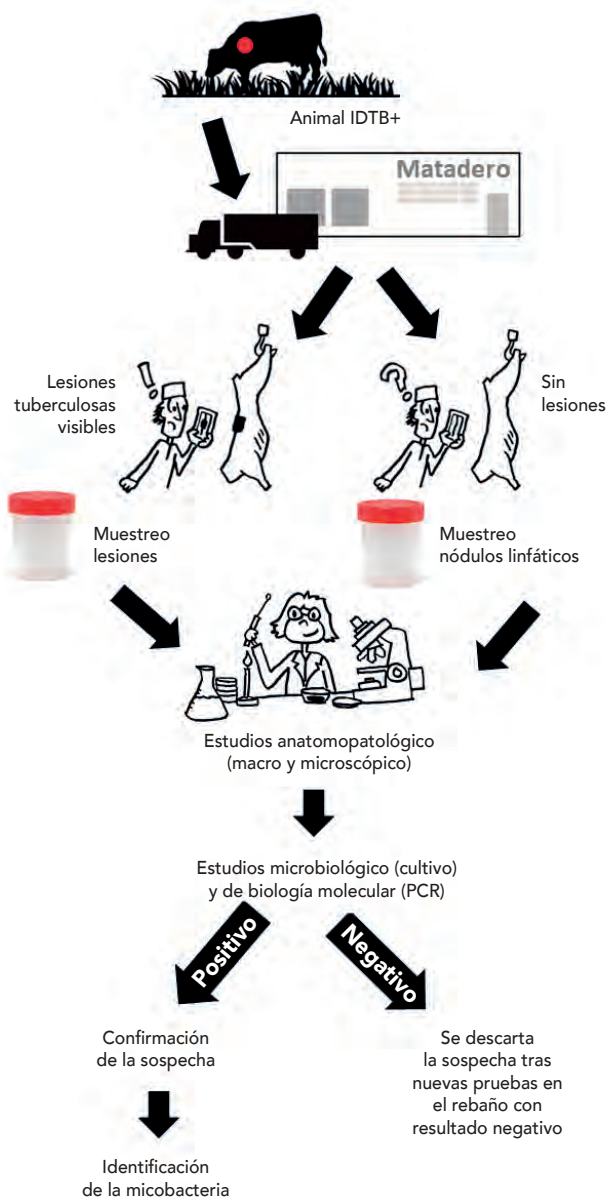


Figura 27. Diagrama del flujo del diagnóstico inicial a la confirmación de tuberculosis.

DetECCIÓN DE NUEVOS BROTES

La presencia de lesiones compatibles con TB en animales sacrificados de rutina para el consumo debe ser siempre investigada ya que podría tratarse de infecciones que no han sido detectadas mediante las pruebas *in vivo*. De hecho, en regiones oficialmente libres de TB, donde ya no se realizan las pruebas cutáneas en las explotaciones de ganado bovino, o se realizan en intervalos más largos de un año, la vigilancia pasiva en matadero pasa a ser la principal o única herramienta de control oficial para la detección de nuevos brotes (Sergeant et al., 2017). En una situación epidemiológica de baja prevalencia de TB en rebaños de bovino, como sucede en el norte de la península, el 14% de los nuevos brotes detectados lo son a través de la vigilancia en matadero (Guta et al., 2014a). De hecho, la inspección *post mortem* es clave para la detección de focos de TB en el ganado porcino, caprino y ovino, que no están sometidos por el momento a programas de vigilancia de TB.

PROTOCOLOS DE INSPECCIÓN

Para ambas situaciones (confirmación de sospechas, vigilancia pasiva) son determinantes los protocolos de inspección *post mortem* y muestreo. Para confirmar el diagnóstico hay que tomar muestras de las lesiones tuberculosas para su análisis, pero en aquellos animales sin lesiones visibles también se debe realizar un muestreo. Las muestras de elección, hasta hace poco, consistían en el pulmón y ciertos nódulos linfáticos (retrofaríngeo, traqueobronquial y mediastínico), ya que se había demostrado que más de un 85% de animales con una sola lesión la tenían en una de estas localizaciones (Corner et al., 1990). Estudios más recientes, sin embargo, demuestran que la vía digestiva puede tener un papel también importante en la infección y en la localización de lesiones (Serrano et al., 2018). Por ello, se han ampliado los tejidos a muestrear para incluir otros linfocentros como los nódulos linfáticos mesentéricos, hepático, pre-escapular, cervical y supra mario (MAPA y VISAVET, 2017). Una inspección *post mortem* más detallada es un buen punto de partida para mejorar la eficacia del plan de erradicación basado en prueba/sacrificio.

Después de muchos años sin modificaciones la normativa de inspección *post mortem* está ahora en proceso de cambio y adaptación a un criterio orientado a los riesgos (EFSA y BIOHAZ, 2013a, 2013b). Entre otras modificaciones, en el ganado porcino se ha cambiado el procedimiento a una inspección visual, eliminando la palpación y corte de ciertos tejidos para reducir el riesgo de contaminación de las canales (EFSA, 2011; EC, 2019). En el caso de la TB en rumiantes, es evidente que este enfoque podría disminuir la Se de la inspección *post mortem* para la detección de lesiones (Willeberg et al., 2018). Un estudio epidemiológico ha valorado que la Se de la vigilancia en mataderos para la detección de TB es

del 31,4%. Este porcentaje tan bajo es debido especialmente a la baja probabilidad (44,8%) de que un animal llegue a matadero presentando lesiones visibles de TB (García-Saenz et al., 2015). Pero el estudio también consideró relevantes otros factores como la formación de los inspectores, el número de auxiliares o la velocidad de la cadena de sacrificio.

El diagnóstico anatomopatológico de la TB se lleva a cabo en tres etapas sucesivas: 1) la identificación macroscópica de lesiones compatibles, 2) su estudio al microscopio y 3) la identificación de la presencia de micobacterias mediante tinciones especiales, como la tinción de Ziehl-Neelsen o las técnicas de inmunohistoquímica.

En los mataderos se lleva a cabo la primera etapa: la identificación de lesiones macroscópicas compatibles con TB. Para ello, se reconoce el patrón morfológico de una inflamación granulomatosa caseosa, frecuentemente con calcificación central del granuloma (crepitación), y a menudo confluyente, que es lo más habitual en los casos de TB bovina (Domingo et al., 2014). Sin embargo, existen otros agentes infecciosos que producen lesiones también de tipo granulomatoso, que pueden tener un aspecto macroscópico compatible con TB, o incluso lesiones de otra naturaleza (como por ejemplo algunas neoplasias pulmonares, o el mesotelioma pleural), que se podrían confundir con algunas formas de TB. Los agentes infecciosos más comunes confundibles con TB son hongos y algunas bacterias que provocan lesiones piogranulomatosas, como *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, etc. Es por ello necesario realizar un análisis laboratorial de todas aquellas lesiones que morfológicamente pueden ser compatibles con un granuloma tuberculoso. Este análisis debe incluir un estudio histopatológico y, en paralelo, microbiológico para la identificación de la causa de la lesión (aislamiento microbiológico, y cultivo específico de micobacterias). Ello se puede complementar con estudios de biología molecular, es decir, identificar mediante PCR la presencia de material genético de la micobacterias. De ser positivo, este resultado fiable se obtiene mucho más rápidamente que el del cultivo de micobacterias, que requiere bastante más tiempo.

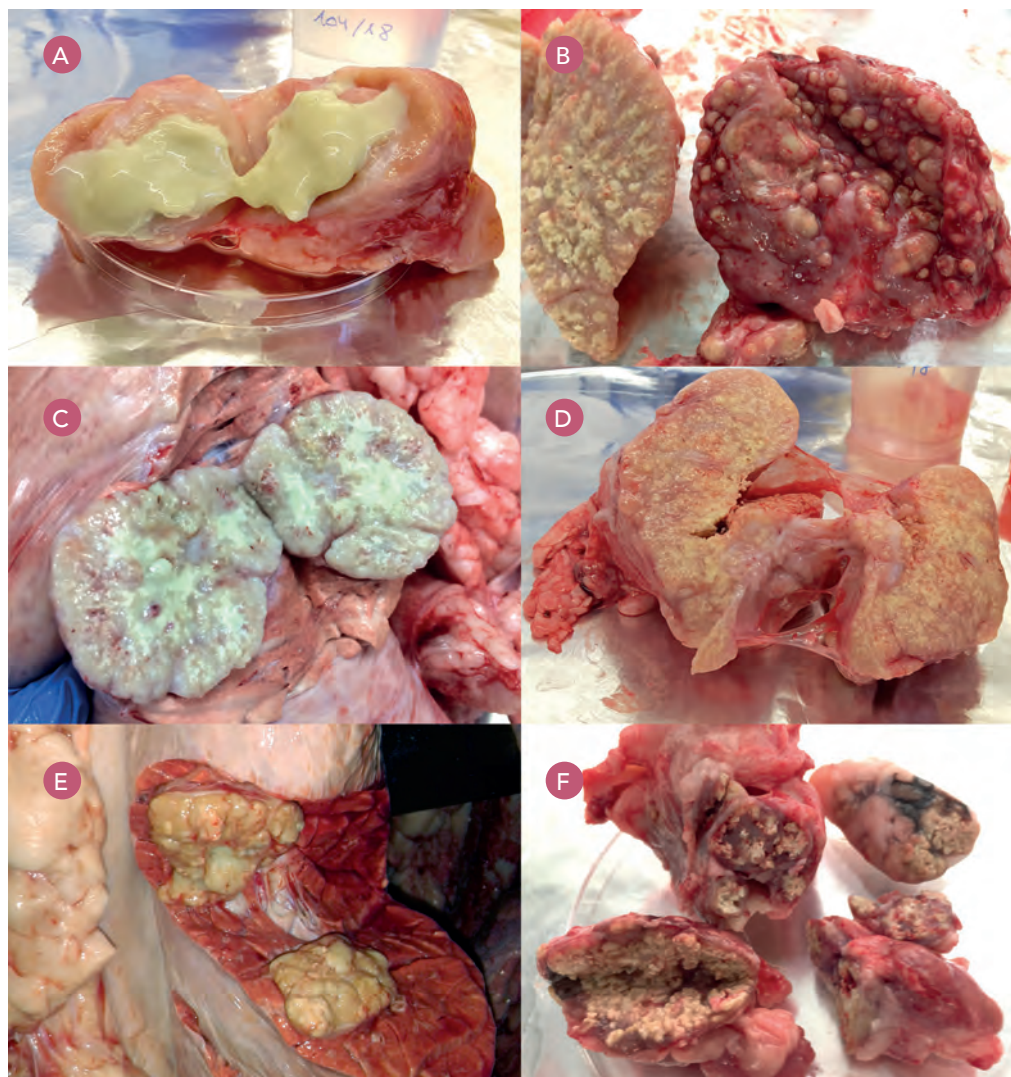


Figura 28. Lesiones compatibles con tuberculosis (TB) detectadas en matadero o sala de manipulación de caza. Aproximadamente la mitad de las lesiones macroscópicamente compatibles con TB que se remiten para su análisis se deben a otras etiologías.

- A) Lesión piogranulomatosa en el nódulo linfático retrofaríngeo de bovino de la que se aisló una bacteria, *Trueperella pyogenes*. B) Lesión granulomatosa en el nódulo linfático retrofaríngeo de un bovino de la que se aisló *Mycobacterium bovis*, confirmando el diagnóstico de TB. C) Lesión granulomatosa en un pulmón de bovino de la que se aisló el hongo *Rhizomucor pusillus*, confirmando el diagnóstico de mucormicosis o neumonía fúngica. D) Lesión granulomatosa en el nódulo linfático retrofaríngeo de bovino, de la que se aisló *Mycobacterium caprae*, confirmando el diagnóstico de TB. E) Lesión granulomatosa en un pulmón de bovino de la que se aisló una bacteria del género *Nocardia*. F) Lesión granulomatosa en el nódulo linfático submandibular de un jabalí del que se aisló *Mycobacterium caprae*, confirmando el diagnóstico de TB.

En áreas de elevada prevalencia, la mayoría de lesiones compatibles con TB serán confirmadas en el laboratorio, pero a medida que disminuye la prevalencia de TB en una zona, una mayor proporción de lesiones granulomatosas detectadas en el matadero serán debidas a otras causas. Esta es una situación delicada, pues puede generar a los inspectores la sensación de que “se equivocan” en su diagnóstico macroscópico. Esto no es así, ya que es lógico que al bajar la prevalencia de TB en una región, el valor predictivo del diagnóstico macroscópico en el matadero disminuya. Pero ello, en ningún caso, debe desincentivar el análisis laboratorial de estas lesiones. Un buen sistema de vigilancia pasiva debería generar un flujo constante de diagnósticos de lesiones no tuberculosas en los mataderos (pero macroscópicamente compatibles con TB); de lo contrario, si no se realizan estos análisis, se pierde capacidad de detectar nuevos brotes de TB.

Se podría pensar que, disponiendo de análisis microbiológicos y de biología molecular, el estudio anatomopatológico es prescindible, pero su realización aporta un gran valor añadido, ya que el intercambio ágil y eficaz de información entre los centros ejecutivos implicados (universidad-administración-matadero) mejora el conocimiento de los inspectores veterinarios respecto de las diferentes etiologías que causan lesiones compatibles con TB y refina su capacidad diagnóstica. Pero sobre todo, en el caso de lesiones compatibles, pero no debidas a micobacterias, un diagnóstico anatomopatológico inicial descarta de forma relativamente rápida (en 2-3 días) la sospecha, y permite incluso ahorrarse el cultivo de micobacterias. En Cataluña funciona desde 2008 el SESC (www.cresa.cat/blogs/sesc), una herramienta ideada como un sistema de formación continuada para veterinarios de matadero que contempla la remisión de consultas telemáticas (imágenes de lesiones), así como de muestras para el diagnóstico laboratorial (Vidal et al., 2015). En el marco de este programa cada año se confirman como casos de TB aproximadamente un 50% de todas las lesiones compatibles que son remitidas para su análisis (Figura 28) (Vidal et al., 2015). Establecer un circuito oficial de este tipo para el análisis de las sospechas es una herramienta muy útil para la vigilancia pasiva de la TB, así como de otras enfermedades emergentes (Pérez de Val et al., 2014).

El espectro lesional que puede presentar la TB es muy amplio, abarcando desde lesiones milimétricas en un solo nódulo linfático hasta grandes lesiones diseminadas por todo el organismo. A grandes rasgos podemos diferenciar tres etapas en la evolución del cuadro lesional de la TB (Domingo et al., 2014), ver Figura 29. (1) Tras la entrada de la micobacteria en el organismo se puede generar una lesión inicial, localizada, de carácter supurativo o granulomatoso. (2) En función del estado inmunitario del huésped, esta lesión puede quedar contenida y encapsulada o cronificarse y extenderse a nivel local pero de forma controlada. El drenaje linfático suele transportar las micobacterias a los nódulos linfáticos

cercanos dónde aparecerán también lesiones. Es por ello que estos son los tejidos de elección para investigar la presencia de lesiones. Se trata de lesiones granulomatosas (aquellas en las que el infiltrado inflamatorio está compuesto por macrófagos principalmente), necrotizantes y con mineralización del tejido necrótico. Ello les da un aspecto blanquecino, endurecido, que recuerda al queso, de ahí el calificativo de lesiones caseosas (del latín *caseum formatigus* o queso). (3) Finalmente, llega un momento en el que el sistema inmunitario no puede contener la infección y ésta se disemina vía linfa o sangre por todo el organismo y aparecen lesiones de TB generalizada. Por ejemplo, los cuadros de TB perladadas en las que múltiples granulomas se forman a la vez en las membranas serosas del peritoneo y la pleura (Domingo et al., 2014). Estos cuadros generalizados son cada vez menos comunes en la situación epidemiológica de nuestro territorio, pero pueden aparecer en matadero ya que estos animales pueden ser anérgicos, es decir, que no responden a las pruebas de inmunidad celular, y por lo tanto, no se detectan mediante las pruebas cutáneas. Estos animales suponen un riesgo significativo para el control de la enfermedad pues pueden excretar grandes cantidades de micobacterias al ambiente sin ser detectados.

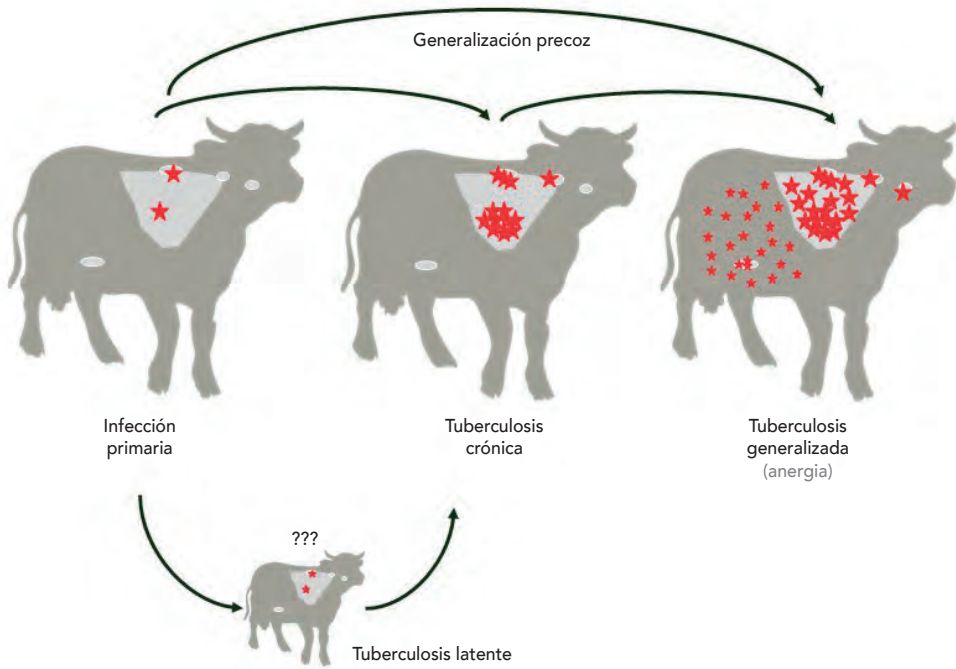


Figura 29. Progresión en el tiempo de la lesión tuberculosa.
La estrella roja representa las lesiones tuberculosas.

Histológicamente las lesiones tuberculosas, es decir, los granulomas, se clasifican normalmente en cuatro tipos (tipo I, II, III y IV), en base a su extensión, infiltrado celular, grado de mineralización y calcificación y, grado de encapsulamiento (Figura 30). Los granulomas de tipo I se caracterizan por no presentar normalmente cápsula y estar formados principalmente por células epitelioides, macrófagos, linfocitos y alguna célula gigante de Langhans. Los granulomas de tipo II suelen presentar el mismo tipo celular que los de tipo I pero en éstos se puede observar una fina cápsula y necrosis central por coagulación. En los de tipo III y tipo IV se puede observar una extensa necrosis caseosa y mineralización, respectivamente, así como una clara cápsula de tejido conjuntivo. El examen histológico es de gran importancia, principalmente, para la detección de lesiones de tipo focal y/o latente, difícilmente observables de otra manera.

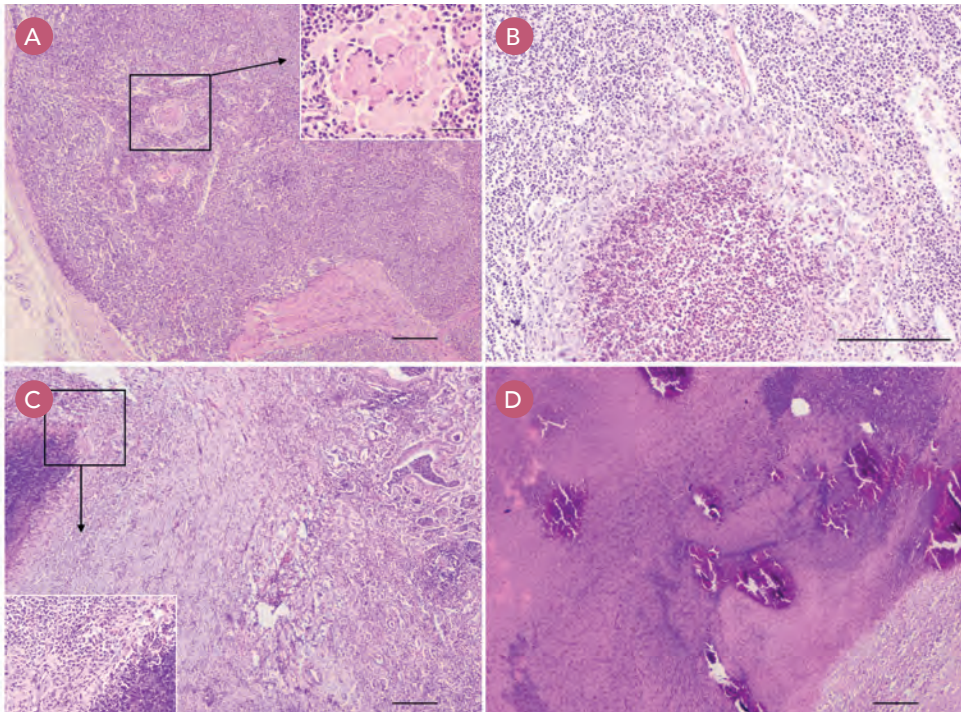


Figura 30. Tipos de granulomas tuberculosos.

A) Tipo I. B) Tipo II. C) Tipo III. D) Tipo IV. Tinción hematoxilina-eosina. Barra=200 micras.

Para conseguir un enfoque global del control de TB, otro punto importante a tener en cuenta son los huéspedes silvestres de la enfermedad. Para ello, un punto de control muy relevante son las salas de manipulación de caza. Se trata de establecimientos que funcionan como los mataderos, pero con las canales de

animales de caza que irán destinadas a consumo humano, y que por lo tanto, cuentan con inspección veterinaria oficial. Como se detalla en otros capítulos de este libro hay varias especies silvestres que juegan un papel importante como reservorios de TB, principalmente los jabalíes y, en menor medida, los ciervos y los gamos (Hermoso de Mendoza et al., 2006; Naranjo et al., 2008; Mentaberre et al., 2014). El programa de vigilancia sanitaria de la fauna silvestre (MAPA, 2017) contempla el análisis de tejidos de fauna silvestre, pero la logística para la obtención de estas muestras puede ser muy compleja, ya que hay muchos actores diferentes implicados (cazadores, agentes rurales, forestales, veterinarios oficiales, etc.). Estos establecimientos son, por lo tanto, un punto de centralización de muestras muy importante que se debe aprovechar. Pero a menudo las lesiones pueden estar restringidas a ciertos nódulos linfáticos y no ser visibles si no se realizan los cortes apropiados en los mismos.

Para cerrar el capítulo de vigilancia en mataderos, no hay que olvidar que la TB puede presentar riesgo de infección para aquel personal que manipule tejidos lesionados de animales infectados (zoonosis ocupacional). Aquí pueden estar especialmente expuestos los matarifes, auxiliares e inspectores veterinarios, así como el personal que realice necropsias de animales infectados, que deberá tomar las medidas de precaución y protección adecuadas.

4.2.6. Detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) mediante técnicas moleculares sobre muestras clínicas y ambientales

Iker A. Sevilla, Víctor Lorente, Lucía de Juan, Lucas Domínguez, Beatriz Romero

Los planes oficiales de control y erradicación de la TB de los países europeos están basados en la detección de animales infectados mediante la prueba *in vivo* de la IDTB y en la inspección *post mortem* de animales sacrificados en los mataderos. La infección en animales reaccionantes a la IDTB o con hallazgos sospechosos de TB puede ser confirmada por medio del aislamiento e identificación de la bacteria (Directiva 64/432/EEC y Real Decreto 1716/2000). El cultivo microbiológico es considerado, a día de hoy, el método diagnóstico de referencia para confirmar la presencia del agente causal de la infección tuberculosa en ganado bovino, es decir, las especies micobacterianas del MTBC. Sin embargo, esta técnica presenta una serie de limitaciones, entre las que destacan la lentitud en la obtención de resultados derivada del tiempo de incubación que requieren estas micobacterias para crecer en el medio de cultivo (hasta 12 semanas), así como ciertos factores que afectan a la Se del procedimiento, tales como la elección de las muestras, las condiciones de almacenamiento, el envío

y procesamiento de éstas, o la aparición de microorganismos contaminantes que pudiesen enmascarar la presencia de las bacterias del MTBC (revisado en el capítulo 4.2.7.). Adicionalmente, siempre es necesario confirmar la identidad del aislamiento por métodos moleculares que garanticen la Sp del diagnóstico (Gormley et al., 2014). Por todo ello, la búsqueda de métodos alternativos o complementarios para la confirmación de la infección se ha vuelto una prioridad en los últimos tiempos. A pesar de que el análisis histopatológico, también reconocido por la Directiva 64/432/EEC, es un procedimiento relativamente rápido y sensible, no es lo suficientemente específico y necesita confirmación por otros medios. Por esta razón, las técnicas moleculares, como pueden ser las de detección del material genético (ADN) micobacteriano en muestras clínicas o ambientales han suscitado un gran interés.

Detección del material genético del MTBC mediante PCR

La detección del ADN de un microorganismo en una muestra indica que éste se encuentra presente en la misma, ya sea vivo o muerto. La técnica más popular para su detección es la PCR (Mullis et al., 1986), que permite amplificar y convertir así en detectables, pequeñas cantidades de ADN diana. La PCR se emplea de forma genérica para la identificación de aislados procedentes de cultivos bacterianos y su introducción en el diagnóstico de la TB, surgió a finales del siglo pasado como una prometedora alternativa que pudiese solventar algunos de los inconvenientes del cultivo. Desde entonces, se han desarrollado infinidad de protocolos de PCR para la detección directa del MTBC en muestras humanas principalmente, y también en tejido animal para el diagnóstico veterinario (Costa et al., 2014a, 2014b).

La amplificación del ADN mediante PCR se produce de manera específica en una parte concreta del material genético mediante el uso de cebadores: pequeños fragmentos de ADN que marcan los límites donde se producirá la amplificación. En función de la forma en la que se detecte el ADN amplificado, las PCRs se dividen en dos clases: PCRs convencionales o PCRs en tiempo real. En el primer caso, la detección del ADN requiere de un procesamiento posterior donde se visualiza el fragmento amplificado en un soporte físico como un gel de agarosa. La PCR en tiempo real, por otro lado, emplea sondas fluorescentes que son detectadas de forma específica tras cada paso de la reacción, permitiendo hacer un seguimiento directo de la cantidad de ADN en la muestra durante todo el proceso.

La eficacia de la PCR se ve afectada por factores relacionados con el diseño de la técnica y con la naturaleza de la muestra a analizar. Desde el punto de vista del diseño, la Sp de esta herramienta depende de que el fragmento de ADN escogido como diana sea específico del agente que se busca, siendo especialmente

importante diseñar cebadores y sondas con la máxima afinidad por éste y la mínima afinidad por el resto del ADN presente en el medio. Aunque la Se de la PCR puede ser tan elevada como para detectar una sola copia del ADN diana en la reacción, ésta está condicionada en gran medida por las condiciones de reacción de la PCR, por lo que la optimización y validación de los reactivos y parámetros empleados es crucial. Por otra parte, la eficacia de la técnica puede verse afectada por la concentración de material genético en la muestra y la presencia de moléculas inhibitoras de la PCR. Esto, a su vez, está directamente relacionado con la carga bacteriana en la muestra y con la eficacia del método de extracción y purificación de ácidos nucleicos. Debido a que las PCRs pueden emplearse en todo tipo de matrices, ya sean aislados bacterianos, muestras clínicas (ejemplo, tejidos) o muestras ambientales (ejemplo, agua), la cantidad de bacterias o de impurezas puede variar considerablemente de una a otra.

Factores que afectan a la detección del MTBC en muestras clínicas: ventajas y desventajas

Actualmente el uso de esta metodología en el diagnóstico de la TB sobre tejidos solo se contempla en situaciones concretas dentro del Programa de erradicación nacional de TB bovina. Sin embargo, los beneficios de esta metodología pueden ser muchos. La ventaja más evidente, junto con una elevada Se y Sp, consiste en el acortamiento del tiempo de respuesta del laboratorio, ya que el resultado de la PCR puede obtenerse en pocas horas desde la recepción de la muestra, lo que permite evitar retrasos innecesarios a la hora de tomar decisiones y actuar sobre los animales o explotaciones bajo análisis. Al contrario de lo que sucede con el cultivo, la Se de la técnica no depende de la viabilidad de las bacterias, pudiendo detectar tanto bacterias vivas como muertas. La presencia de otras bacterias no debería interferir en la PCR, por lo que la descontaminación de la muestra con agentes agresivos y tóxicos no es necesaria, lo cual supone una mayor seguridad para el personal de laboratorio. Por otra parte, al trabajar directamente con tejidos y no con aislados bacterianos, se reduce el riesgo biológico para los trabajadores y se disminuye el tiempo que deben pasar dentro de un laboratorio de bioseguridad de nivel 3.

Los principales factores que afectan a la detección de estos patógenos directamente en la muestra están asociados con la PCR empleada y la extracción del ADN de la muestra. La selección de la diana genética para la PCR es un elemento clave para la técnica. La diana genética más popular usada en la detección y genotipado del MTBC, tanto de origen humano como animal, es la secuencia de inserción o transposón IS6110 (Eisenach et al., 1990; Thierry et al., 1990; Savelkoul et al., 2006; Soo et al., 2006; Thacker et al., 2011; Costa et al., 2014b). Esto se debe a que se trata de un elemento presente en múltiples copias (1->25) en el

genoma de los miembros del complejo, lo que incrementa la Se de la prueba (Narayanan, 2004). *Mycobacterium bovis* suele tener 1-2 copias, aunque se han identificado algunas cepas con más copias o incluso sin ellas (Das et al., 2005). Al ser un elemento multicopia y no hallarse en el mismo número de copias en todas las cepas, no es un buen marcador para realizar cuantificación por PCR. A pesar de haberse detectado algunos problemas de Sp que se van solventando mediante el rediseño de cebadores y sondas (Savelkoul et al., 2006; Thacker et al., 2011), continúa siendo la diana más utilizada. Además de esta, también se han utilizado otras secuencias específicas del MTBC (Tabla 7).

Tabla 7. Dianas genéticas utilizadas para la detección del complejo *Mycobacterium tuberculosis* o de algunas de las especies que éste engloba mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Diana genética	Bibliografía de ejemplo
IS6110	Miller et al., 1997
IS1081	Taylor et al., 2007
IS1561'	Barbier et al., 2016
RDs	Costa et al., 2014a
<i>mpb70</i>	Lorente-Leal et al., 2019
16S-23S rRNA	Parra et al., 2008
<i>gyrB</i>	Chiari et al., 2016
TbD1	Araújo et al., 2014b
<i>rv2807</i>	Araújo et al., 2014c
<i>rv3873</i>	Quan et al., 2016
<i>rv3866</i>	Barbier et al., 2016
<i>rvD1rv2031c</i>	Rodríguez et al., 1999
<i>devR</i>	Sevilla et al., 2015
<i>rimM</i>	Zhu et al., 2009
<i>mpt83</i>	Zhang et al., 2011
<i>hupB</i>	Algammal et al., 2019

La mayoría de métodos de detección de ácidos nucleicos que se utilizan para el diagnóstico de la TB animal son diseños caseros en mayor o menor medida y con un uso más o menos extendido entre los diferentes laboratorios (Costa et al., 2014b). Sin embargo, también se emplean productos comerciales, tales

como artus® M. TB™ qPCR Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Alemania), FluoroType® MTB (Hain Lifescience GmbH, Nehren, Alemania), LSI VetMAX™ *Mycobacterium TB* Complex PCR (Life Technologies Ltd., Paisley, Escocia), COBAS® TaqMan® MTB Test kit (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza) o MYCO-Direct 1.7 LCD-Array Kit (Chipron GmbH, Berlin, Alemania).

Otra de las virtudes de la tecnología de la PCR es su capacidad de convertirla en una herramienta de detección múltiple en un único ensayo, ofreciendo mayor rapidez y eficiencia al proceso diagnóstico. Algunos autores han aprovechado ese potencial aplicando el método directamente a ADN extraído de tejidos animales para detectar y diferenciar simultáneamente el MTBC de otras micobacterias no tuberculosas, que además pueden provocar ciertas interferencias en el diagnóstico de la TB animal (Costa et al., 2014a; Sevilla et al., 2015; Thakur et al., 2016), o también para identificar la especie del MTBC presente en la muestra (Costa et al., 2015; Elsayed y Amer, 2019). En la Figura 31 se muestra una propuesta para el diagnóstico molecular para la detección e identificación de miembros del MTBC y su diferenciación de otras micobacterias no tuberculosas, a partir de ADN extraído directamente de muestra clínica propuesto por Costa et al. (2014a).

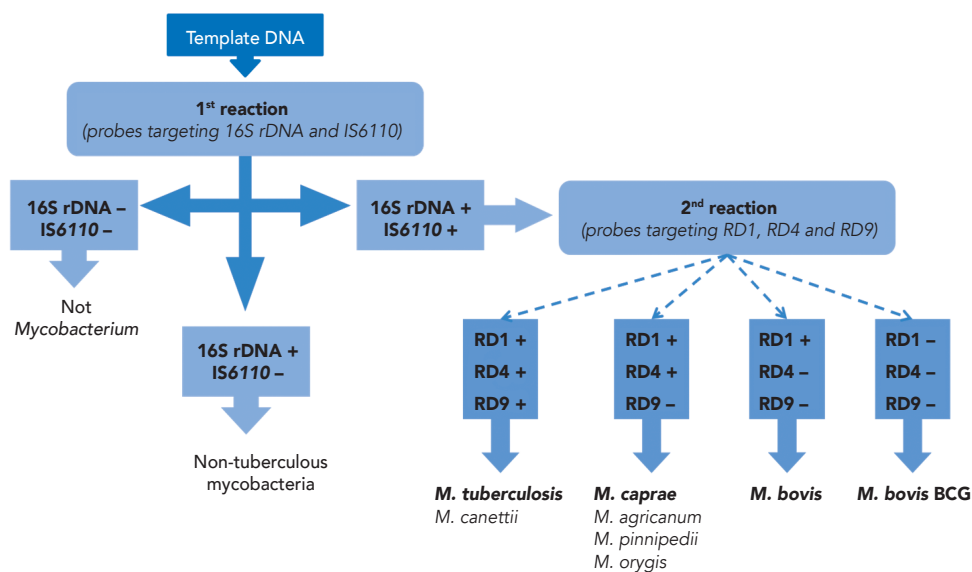


Figura 31. Algoritmo para el diagnóstico del complejo *Mycobacterium tuberculosis* propuesto por Costa et al. (2014a).

Como se mencionó anteriormente, uno de los factores más importantes que influyen en el correcto funcionamiento de la PCR no radica en la técnica en sí, sino en la naturaleza del patógeno y en los procesos de concentración de las bacterias, y de extracción y de purificación del ADN de éstas (Radomski et al., 2013). La distribución de las micobacterias en el tejido no es homogénea, y en ausencia de lesiones visibles, la cantidad de éstas, y en consecuencia del ADN diana disponible, puede ser insuficiente, aunque esta limitación también puede ser importante en el caso del cultivo bacteriológico (Corner et al., 2012; Gormley et al., 2014). Los bacilos del MTBC se ubican típicamente dentro de las células huésped infectadas, que al mismo tiempo pueden encontrarse dentro de granulomas, mostrando a veces un alto nivel de fibrosis y/o calcificación, lo que complica la extracción de su ADN (Radomski et al., 2013). Además, las micobacterias poseen una pared celular muy compleja y resistente, que dificulta enormemente la liberación de su ADN por los métodos de extracción rutinarios. Por ello, muchos de los esfuerzos de los investigadores se centran en el desarrollo de métodos de extracción de ácidos nucleicos más eficientes (Leth et al., 2017). La Se de las técnicas moleculares en tejidos fijados en formol e incluidos en parafina también se ha evaluado, aunque en estos casos los resultados son moderados (\approx 75% con respecto al cultivo) (Costa et al., 2014b).

Conviene tener en cuenta que el volumen de ADN extraído de la muestra que se puede analizar en una reacción de PCR, es muy pequeño (2-10 μ l normalmente), por lo que la muestra original queda escasamente representada. Asimismo, en el proceso de extracción del material genético se obtiene además una gran cantidad de ADN del animal hospedador que puede interferir con la amplificación del ADN micobacteriano (Cardoso et al., 2009; Radomski et al., 2013), particularmente si éste se encuentra en una proporción muy baja. Además de un exceso de ADN, la presencia de sustancias inhibitoras en el tejido o en los reactivos empleados para la extracción, que no hayan podido eliminarse mediante el proceso de purificación del ADN, puede afectar negativamente a la Se de la técnica (Cardoso et al., 2009; Radomski et al., 2013). La aparición de falsos negativos causada por los inhibidores de la PCR puede ser monitorizada si se incluye un control interno de amplificación en la reacción, que consiste en detectar de manera simultánea o por separado una secuencia de ADN del hospedador o exógeno de origen natural o sintético (Radomski et al., 2013).

Para solventar la falta de concordancia entre técnicas (cultivo, pruebas de respuesta inmunitaria, detección de ácidos nucleicos e histopatología) y afinar al máximo en el diagnóstico, algunos grupos han desarrollado una estrategia de diagnóstico de segunda línea para utilizar junto con las de primera línea (Michelet et al., 2018). De este modo, partiendo de ADN extraído directamente de la muestra clínica, pueden llegar a diferenciar entre micobacterias del MTBC,

micobacterias no tuberculosas y otros agentes que histológicamente además producen lesiones similares, como pueden ser *Gordonia* spp., *Nocardia* spp. y *Rhodococcus* spp. Así, la estrategia proporciona información rápida sobre la TB animal o cualquier otra infección micobacteriana.

Detección del MTBC en muestras clínicas: estado actual

Ya que las especies del MTBC son patógenos intracelulares obligados, la detección de su ADN en muestras clínicas de hospedadores susceptibles indica infección en el animal. Debido a que las metodologías empleadas para la detección de MTBC no están estandarizadas, los resultados de los estudios no se pueden comparar entre sí de manera robusta, ya que se observan diferencias en el tipo de tejido analizado, la especie de origen, el estado de infección del animal, la categorización patológica del tejido (lesiones visibles o no), el número de muestras, el método de obtención del ADN, así como en el tipo de PCR y diana genética seleccionada, entre otras. Sin embargo, en esta sección se resumen los estudios y resultados más importantes obtenidos hasta el momento, en comparación con el cultivo bacteriológico.

La Se y Sp de la PCR convencional aplicada a tejidos con y sin lesiones visibles compatibles con TB se sitúa en un 63-97% y en un 50-97%, respectivamente (Liébana et al., 1995; Wards et al., 1995; Taylor et al., 2001; Zumárraga et al., 2005). Los primeros abordajes para mejorar la Se se centraron en el uso de la PCR anidada (Wards et al., 1995; Mishra et al., 2005), capaz de incrementar la cantidad de ADN obtenida en una primera reacción de amplificación mediante una segunda donde se carga el producto de la anterior. De esta forma, Mishra et al. (2005) atribuían a la PCR anidada una Se del 97,3% frente al 29,7% del cultivo, si bien la Sp fue inferior en la PCR (22,2% versus 77,7%). Debido a la necesidad de cargar la muestra amplificada en una segunda reacción, este formato requiere muy buenas prácticas de laboratorio y medidas efectivas de control de calidad, que eviten la aparición de falsos positivos por contaminaciones cruzadas (Costa et al., 2014b). La PCR en tiempo real ofrece valores más elevados que oscilan entre el 65,6% y el 100% de Se y entre el 97% y el 100% de Sp, incluso cuando es aplicada a muestras fijadas con formol incluidas en parafina (Parra et al., 2008; Gómez-Laguna et al., 2010; Courcoul et al., 2014). Con ese propósito de obtener un aumento de Se, también se ha explorado la aplicación de la PCR anidada en formato de tiempo real, al menos para la segunda ronda de amplificación, obteniendo buenos resultados, tanto de Se (70,4-100%) como de Sp (88,7-100%) (Taylor et al., 2007; Costa et al., 2013, 2014b; Araújo et al., 2014b, 2014c). El estudio más reciente sobre comparación de métodos diagnósticos para la confirmación de animales reaccionantes a la tuberculina donde se incluyeron 2.600 vacas de Egipto, también indica

una supremacía de la Se de la PCR sobre la del cultivo (85,1% versus 63,8%) (Algammal et al., 2019).

En España, el uso de la PCR para la detección de especies del MTBC en tejidos animales tiene sus orígenes en los 90, donde la PCR convencional ofrecía una Se y Sp diagnóstica del 71,40% y 93,75%, respectivamente (Liébana et al., 1995). Aunque la introducción de la PCR en tiempo real tuvo resultados moderados, con una Se del 65,6% (Parra et al., 2008), un estudio reciente ha corroborado la elevada capacidad diagnóstica de la técnica, en línea con el resto de estudios contemporáneos (Lorente-Leal et al., 2019). En este caso, la capacidad de una PCR en tiempo real para detectar el gen *mpb70* en muestras tisulares bovinas, en comparación con el cultivo (considerando positivas aquellas muestras negativas en el cultivo que se confirmaban por otras técnicas), se establecieron en un 94,59% de Se y un 96,03% de Sp diagnóstica.

La mayoría de los estudios publicados en la literatura científica evalúan la eficiencia de la PCR frente al cultivo microbiológico como técnica de referencia. Sin embargo, debido a las limitaciones del cultivo, esta comparación puede suponer algunos sesgos en detrimento de la técnica que se compara. Debido a que la Se del cultivo no es del 100% (Gormley et al., 2014), pueden aparecer muestras realmente positivas que la PCR sí ha detectado y el cultivo no. Este efecto se puede ver incrementado cuando la bacteria se encuentra en un estado no cultivable o si la cepa o especie implicada es más complicada de aislar *in vitro*, como es el caso de *M. microti* (Boniotti et al., 2014). Lógicamente, en esa situación la PCR resulta una herramienta mucho más eficaz que el cultivo para detectar las bacterias presentes en la muestra y ofrecer un diagnóstico. Por esta razón, existe un interés en emplear modelos estadísticos para realizar esta comparación. Así, en un análisis sobre la capacidad diagnóstica de la PCR en tiempo real (LSI VetMAX) llevado a cabo en Francia utilizando una población de más de 5.000 animales (Courcoul et al., 2014), los valores de Se y Sp globales calculados utilizando un modelo bayesiano fueron del 87,7% y 97,0% para la PCR, superando a los del cultivo, que fueron del 78,1% y 99,1%, respectivamente.

Además del empleo de esta nueva metodología en tejidos bovinos, existe un creciente interés en evaluar y validar su uso en otras especies animales que actúan como reservorios de la TB. Las PCRs pueden ser especialmente importantes en el diagnóstico en especies más complicadas de muestrear y transportar como son el jabalí o el ciervo y, donde la presencia de otras micobacterias o la conservación de la muestra pueden afectar negativamente al cultivo. Por tanto, existen cada vez más publicaciones en las que la PCR se emplea con muy buenos resultados en especies domésticas no bovinas, como el ganado porcino y caprino (Leth et al., 2017; Barandiaran et al., 2019), o silvestres como el ciervo, el tejón o el jabalí (Wards et al., 1995; Costa et al., 2013).

DetECCIÓN DEL MTBC EN MUESTRAS AMBIENTALES

La PCR puede ser muy útil para detectar la presencia de especies del MTBC en muestras ambientales, como pueden ser el agua, campos de pastoreo, piensos o alimentos derivados de la ganadería (ejemplo, leche cruda). Como ya se ha mencionado, este método amplifica y detecta de la misma manera ADN proveniente de bacterias vivas y muertas por lo que, si se pretende identificar exclusivamente la presencia de bacterias vivas, y por lo tanto infecciosas, la PCR no es adecuada por sí sola.

Las micobacterias en general son muy resistentes a factores adversos como pueden ser las condiciones ambientales o los tratamientos o procesos de elaboración que se aplican a los productos derivados de la ganadería. *Mycobacterium bovis* es relativamente resistente en el medio, pudiendo persistir en éste durante semanas o meses, sobre todo si las condiciones son apropiadas, por ejemplo, a temperaturas frescas y protegidas de la luz solar (Palmer et al., 2012). Se piensa que la transmisión indirecta de *M. bovis* a través de la ingestión o inhalación de substratos contaminados puede jugar un papel en la epidemiología de la enfermedad en la especie bovina y en la fauna silvestre (Kaneene et al., 2002; O'Brien et al., 2002; Miller et al., 2003; Palmer et al., 2012). Se han llevado a cabo varios experimentos para estudiar la persistencia de *M. bovis* en el medio ambiente utilizando el cultivo. Hace ya casi un siglo que Williams y Hoy (1930) observaron que las bacterias presentes en las heces de una vaca infectada sobrevivían hasta 4 meses cuando éstas fueron artificialmente diseminadas por los investigadores en el pasto y hasta 12 meses cuando éstas se almacenaron en un lugar fresco y oscuro. Según un estudio llevado a cabo en el estado de Michigan, los bacilos artificialmente inoculados de *M. bovis* pueden sobrevivir hasta 43 días sobre maíz, 58 días en agua y en heno y 88 días en el suelo en condiciones ambientales naturales, aunque para que exista una transmisión ambiental, los bacilos deben estar accesibles para los animales, por lo que algunos autores inciden más en la importancia de la supervivencia de las bacterias en los alimentos usados habitualmente como suplemento alimenticio (Palmer et al., 2012) y en puntos de agua contaminada utilizados como abrevaderos por animales domésticos y silvestres (Barasona et al., 2017). Otros trabajos han demostrado que este miembro del complejo puede persistir en el medio por periodos de entre 4 semanas y 6 meses, tiempo que se ve reducido por el efecto de la exposición a temperaturas más altas, radiación solar más intensa y pérdida de humedad por evapotranspiración, todos ellos factores relacionados con los cambios estacionales (revisado en Adams et al., 2013).

Por todo ello, los grupos de investigación también han centrado sus esfuerzos en el estudio de la presencia del MTBC en el medio ambiente y en su posible papel en la epidemiología de la TB animal. Muchos de estos trabajos no han podido demostrar la presencia de micobacterias viables por medio del cultivo

bacteriológico, por lo que consideraron nula la posibilidad de transmisión a través del ambiente, dejándolo fuera de los factores que repercuten en la epidemiología de esta infección (revisado en Adams et al., 2013). Sin embargo, tal y como se explicaba anteriormente, las limitaciones del cultivo pueden haber afectado a los resultados de esos estudios, pudiendo ser complementados con un análisis molecular como la PCR.

Según un estudio llevado a cabo en el ambiente de una explotación bovina, el número de muestras positivas a la PCR fue significativamente mayor que las positivas al cultivo, pudiendo detectar el ADN de *M. bovis* en suelo hasta 12 meses después de que hubiese sido posiblemente contaminado (Young et al., 2005). Adams et al. (2013) compararon el cultivo bacteriológico con una PCR anidada para la detección de la bacteria en diferentes matrices (heno, maíz, suelo y agua) artificialmente inoculadas y mantenidas bajo condiciones ambientales naturales por diferentes periodos de tiempo. Mientras que *M. bovis* dejaba de ser detectable por cultivo tras 2 meses, su ADN era detectable por medio de la PCR al menos hasta 7 meses. Los autores concluyeron que, para estudios epidemiológicos con análisis de muestras ambientales, la PCR es más rápida que el cultivo, no se ve limitada por la presencia de microorganismos contaminantes y es capaz de detectar las micobacterias durante periodos mucho más largos, por lo que permite caracterizar de manera más exacta la distribución de *M. bovis* en el ambiente de las explotaciones, conclusión extrapolable a otros medios. Similares conclusiones se obtuvieron en otro trabajo donde analizaron la supervivencia del patógeno y su detectabilidad por medio del cultivo y la PCR en suelo de diferentes características fisicoquímicas contaminado artificialmente, donde además observaron mayor supervivencia a más bajas temperaturas, mientras que el impacto de las características del suelo no se pudo demostrar (Barbier et al., 2016). Sin embargo, las mismas limitaciones que afectan a la PCR en muestras clínicas también lo hacen en muestras ambientales. Particularmente, la carga bacteriana puede ser muy baja en muestras ambientales y, debido a la complejidad de éstas, pueden además contener multitud de inhibidores de la PCR. Por esta razón, los controles de inhibición y los métodos de purificación son críticos en este tipo de aplicaciones.

Un estudio sobre detección de especies del MTBC en muestras ambientales por métodos moleculares, demostró una extendida contaminación ambiental en la Península Ibérica (Santos et al., 2015b). La detección de ADN del MTBC fue menor en áreas presumiblemente negativas que en áreas con incidencia de TB confirmada, y mayor en el sedimento de las presas de agua que en el propio agua contenida en las mismas. También pudieron identificar ADN específico de *M. bovis*/*M. caprae* en varias muestras del área positiva a TB. Un trabajo llevado a cabo recientemente en Etiopía sobre agua y tierra ambientales, identificó ADN del MTBC en más del 90% de las muestras de agua con una carga de hasta $7,3 \times 10^2$ genomas bacterianos/ml (King et al., 2017). En la publicación más actual sobre la detección

molecular del MTBC en muestras ambientales, Barasona et al. (2017) revelaron la presencia de ADN del complejo en el 55,8% de las muestras de barro recogidas en la orilla de los puntos de agua y en el 8,9% de las muestras de agua contenidas en los mismos. Además, encontraron una mayor proporción de muestras positivas en los puntos de agua donde se observaban más animales caquéuticos, de acuerdo con las imágenes obtenidas por medio de fototrampeo.

Cabe mencionar que el MTBC también ha sido detectado en productos ganaderos destinados al consumo humano como leche y queso entre otros, no solo por medio de su aislamiento en cultivo, sino también aplicando métodos moleculares (Kaneene et al., 2014; Pereira-Suárez et al., 2014; Pérez-Lago et al., 2014; Cezar et al., 2016; Sevilla et al., 2017).

Otros métodos moleculares, avances y nuevas perspectivas en investigación

A pesar del uso de la PCR como herramienta de detección del MTBC, en los últimos años se han desarrollado diversos métodos moleculares en muestras biológicas y ambientales.

La amplificación isotérmica mediada por bucle o LAMP (del inglés "loop-mediated amplification") muestra ciertas ventajas en comparación con la PCR. Debido a la diferencia en los reactivos empleados, la reacción se realiza a temperaturas inferiores y constantes (60-65 °C), permitiendo así una elevada eficiencia de amplificación, y soportando mejor la presencia de inhibidores. Los cebadores deben ser muy específicos y en este caso suelen usarse entre 4 y 6. Estas características permiten que pueda ser usada en condiciones de campo sin equipamiento ni personal especializados. Este método ha sido utilizado para la detección de *M. bovis* a partir de ADN extraído de hisopos orales y conjuntivales y de esputos procedentes de vacas positivas y negativas a la prueba de la tuberculina (Zhang et al., 2011), mostrando una Se superior a la de la PCR convencional. La LAMP puede ser de gran utilidad, por ejemplo para realizar estudios sobre poblaciones silvestres en condiciones de campo si se combina con un método portátil específico de identificación de los productos de amplificación (Silva et al., 2011; Costa et al., 2014b).

Un grupo de investigadores del Reino Unido ha desarrollado un protocolo de detección de *M. bovis* en sangre bovina basándose en la tecnología de amplificación de fagos (Swift et al., 2016). Ésta fue desarrollada para detectar y cuantificar rápidamente micobacterias patógenas de crecimiento lento (Albert et al., 2002; Rees y Botsaris, 2012) y para identificar resistencias a antibióticos (Albert et al., 2004) y el estado latente o durmiente de las mismas (Swift et al., 2014). El método utiliza un virus bacteriano (bacteriófago) que infecta, se multiplica y mata específicamente las micobacterias viables. Posteriormente, el ADN de las bacterias muertas se puede detectar mediante un método de amplificación. Los autores determinaron que un sistema de amplificación isotérmica por una polimerasa

recombinasa (RPA, del inglés "Recombinase Polymerase Amplification") previamente descrita, que amplifica la secuencia IS6110, proporcionaba los mejores niveles de Se (Swift et al., 2016). Las principales ventajas de este método serían su rapidez comparada con el cultivo (48 h versus 2-4 meses) y su capacidad de detectar solo células viables en comparación con la PCR que detecta células vivas, muertas o durmientes indistintamente. De este modo, utilizando sangre de animales positivos a la IDTB, que posteriormente fueron histopatológicamente categorizados, detectaron MTBC viable en la sangre del 85% y del 57% de animales con o sin lesiones visibles, respectivamente. Sin embargo, nuevos estudios son necesarios para confirmar esta hipótesis.

Otra de las tecnologías de aplicación en diagnóstico es la PCR digital, una variante reciente de la PCR. Este tipo de ensayo es capaz de detectar y/o cuantificar específicamente el ADN diana presente en la muestra, al igual que la PCR cuantitativa en tiempo real, pero de forma más simplificada, puesto que no necesita referencias o patrones. Detecta el producto de PCR al final del proceso, por lo que la eficiencia de la reacción no afecta a los resultados. Es muy precisa y sensible, especialmente con bajas concentraciones de la diana molecular y en matrices complejas, además de soportar mejor la presencia de inhibidores de la reacción de amplificación. Por el momento, de acuerdo con lo hallado en la bibliografía, el número de estudios científicos donde se utiliza la PCR digital para la detección y cuantificación de los agentes implicados en la TB animal en muestras clínicas se limita al estudio de la infección en el ser humano y en animales de experimentación (Devonshire et al., 2015; Song et al., 2018).

Finalmente, la secuenciación masiva podría facilitar el diseño de nuevas técnicas de diagnóstico, tanto en medicina humana como en veterinaria durante los próximos años. Desde un punto de vista diagnóstico, esta tecnología de alto rendimiento permite, entre otras cosas, realizar la secuenciación del genoma completo de las bacterias (WGS, del inglés "whole genome sequencing") o también la secuenciación dirigida, por ejemplo al gen 16S rRNA, para identificar las bacterias presentes en una muestra. El uso de estas tecnologías representa un campo aún por explorar para el desarrollo de nuevas estrategias de detección e identificación del MTBC directamente en muestras de origen animal o ambiental, sin necesidad de esperar a obtener un aislamiento por medio del cultivo (King et al., 2017). Sin embargo, la WGS se aplica por el momento a aislados bacterianos básicamente, con el fin de realizar estudios epidemiológicos y filogenéticos (revisado en el apartado 4.1.1.), no a tejidos o muestras similares. Concretamente, se ha publicado un estudio donde se utiliza sobre ADN extraído del tejido animal, identificando ciertas limitaciones relacionadas con la cantidad y pureza del ADN de partida (Leth et al., 2017). No obstante, gracias a estos métodos, se han descubierto SNPs con potencial diagnóstico sobre los que basar nuevas herramientas de detección de los agentes del MTBC (Hauer et al., 2019).

Si bien es cierto que las tecnologías anteriores pueden suponer un avance en el diagnóstico de la TB animal, a día de hoy los costes asociados a estas técnicas son demasiado elevados y su utilidad real aún está por demostrar con un número mayor de estudios científicos. Debido a esto, la mayoría de los esfuerzos en investigación se centran en aumentar la Se y Sp de la PCR en tiempo real, así como en facilitar su uso y reducir sus costes, con el propósito de detectar o descartar de forma rápida y fiable la presencia del MTBC en los animales o en el ambiente. Una de las posibles mejoras en el proceso de extracción consiste en la captura del ADN micobacteriano con el fin de concentrarlo y separarlo del resto del ADN presente en los homogeneizados de las muestras. Esta captura puede realizarse antes de la extracción del ADN, mediante el uso de proteínas específicas de las especies del MTBC (Stewart et al., 2013; Grant y Stewart, 2015), como *M. bovis*, o después, mediante el uso de secuencias específicas de ADN (Roring et al., 2000; Fell et al., 2016). En el primer caso, se recubren microesferas magnéticas con anticuerpos anti-*M. bovis* o con péptidos específicos que se adhieren a las paredes celulares de los bacilos presentes en el macerado de la muestra, que luego son separadas de esa matriz gracias a un imán (Stewart et al., 2013; Grant y Stewart, 2015). Es lo que se denomina separación inmunomagnética y separación mediada por péptidos. Esta estrategia puede utilizarse para concentrar las micobacterias y cultivarlas o someterlas a extracción de ADN. De este modo, Stewart et al. (2013) detectaron especies del MTBC en el 54,94%, 44,14% y 2,63% de tejidos sin lesiones visibles mediante cultivo y PCR tras separación inmunomagnética y cultivo directo, respectivamente. Por otro lado, la captura mediante secuencia se basa en el uso de ADN específico de las bacterias que está combinado con biotina, que después es capturada por esferas magnéticas recubiertas de una proteína específica, la estreptavidina. Al comparar este método con una extracción clásica y con una simplificación de este nuevo desarrollo, se observó que tanto éste como su versión simplificada incrementaban la Se de la detección.

Otra alternativa para mejorar la extracción de material genético consiste en incrementar la cantidad de muestra. Este es el fundamento del protocolo Matrix Lysis en el cual se realizó una lisis química utilizando altas concentraciones de urea para solubilizar grandes cantidades de tejido bovino o de cévido sin lesiones visibles, culminando el proceso de extracción con un kit de extracción comercial (Leth et al., 2017). Tras el Matrix Lysis con una extracción directa partiendo de la pequeña cantidad recomendada por el fabricante y de homogeneizados de las muestras, concluyeron que esta metodología era rápida, precisa y más sensible que los otros métodos con muestras sin lesiones (46,7% Matrix Lysis versus 6,7% cultivo directo).

Finalmente, la microfluídica y la nanotecnología pueden también proporcionar herramientas muy versátiles que se pueden utilizar de forma sencilla y prácticamente sin equipamiento ("point of care"). Además, pueden incrementar enormemente la capacidad de diseñar técnicas de detección múltiple simultánea. Esta

tecnología se ha empleado para generar el GeneXpert de Cepheid (Sunnyvale, California), que se utiliza para diagnosticar TB en seres humanos. Sin embargo, esta tecnología resulta aún demasiado cara y no se ha publicado su utilización con muestras clínicas de origen animal directamente.

En definitiva, existe una gran diversidad de estudios científicos relacionados con la detección de las micobacterias del MTBC en muestras clínicas y ambientales. Durante los últimos años, hay una tendencia clara hacia el uso de las PCRs a tiempo real y mejora de los protocolos de extracción del material genético. Esta metodología presenta una elevada capacidad diagnóstica, mostrando en general una elevada Se y Sp, además de un tiempo de análisis muy reducido en comparación con el cultivo bacteriológico, aunque hay que destacar que no distingue entre bacterias vivas y muertas. Las limitaciones de cada protocolo (Se y/o Sp) se deben tener en cuenta para determinar si esta metodología se puede emplear en un futuro de forma alternativa al cultivo bacteriológico, una vez incluida dentro de la legislación.

4.2.7. Técnicas bacteriológicas

Víctor Lorente, Lucía de Juan, Javier Bezos, Lucas Domínguez, Beatriz Romero

El cultivo microbiológico de las micobacterias es una de las pruebas oficiales de diagnóstico de la TB recogida en la legislación europea y nacional. El principal objetivo de esta técnica es la detección de bacterias vivas en un medio de cultivo en el laboratorio, es decir, el aislamiento de las especies del MTBC en las muestras clínicas de elección. La obtención de estos aislados es además la base para establecer los vínculos epidemiológicos entre las distintas granjas y/o los animales silvestres infectados mediante el estudio genético del agente causal.

En este capítulo trataremos los principales aspectos relacionados con el cultivo de las bacterias del MTBC. La primera característica a destacar cuando hablamos del cultivo de MTBC es que estas bacterias tienen un crecimiento extremadamente lento y, por ello, la obtención de resultados en el laboratorio puede prolongarse incluso hasta tres meses, hecho que retrasa, por ejemplo, la recuperación de la calificación sanitaria de la explotación. En segundo lugar, hay que recalcar la importancia de la interpretación correcta de los resultados obtenidos mediante esta técnica, ya que la obtención de un cultivo positivo a MTBC confirma la presencia del agente causal de la infección. Sin embargo, un resultado de cultivo negativo a MTBC en animales reaccionantes a las pruebas de campo oficiales, indica únicamente que no se ha podido aislar el agente causal por este método. Este resultado negativo depende en gran medida de varios factores a tratar en

esta sección, como el estadio en el que se encuentre la infección en el animal, el tipo de lesión que presente o la correcta toma de muestras en el matadero.

A nivel laboratorial, el cultivo microbiológico de las principales especies del MTBC en animales, *M. bovis*/*M. caprae*, requiere controlar tres etapas críticas que determinan el éxito de este método: 1) la selección, toma y conservación de las muestras; 2) la descontaminación de las muestras para eliminar otros microorganismos contaminantes y; 3) la siembra en los medios de cultivo (Corner et al., 2012). Una vez se detecte el crecimiento en los medios de cultivo es necesario aplicar otras técnicas que identifiquen si la bacteria que ha crecido pertenece al MTBC, por ejemplo, mediante la PCR.

Selección, muestreo, conservación y transporte de las muestras

Las especies bacterianas del MTBC son patógenos que viven en el interior de las células del hospedador, concretamente en un tipo de célula inmune denominada macrófago. Por esta razón, suelen encontrarse en primera instancia en los nódulos linfáticos cercanos al lugar donde se produce la infección. Si se trata de una transmisión por vía aérea (aerógena), entrarán en contacto con los nódulos linfáticos de la cadena respiratoria, mientras que, si la transmisión ocurre por ingesta (digestiva), lo harán con los nódulos linfáticos gastrointestinales (Serrano et al., 2018). Desde estas localizaciones, las especies del MTBC pueden migrar a otros ganglios o nódulos linfáticos e incluso a otros órganos parenquimatosos como los pulmones, el hígado o la glándula mamaria.

En un intento de eliminar al patógeno, el sistema inmune del hospedador lo encapsula en un tipo de lesiones características conocidas como granulomas. Estas lesiones varían en su tamaño y dispersión a medida que la enfermedad progresa (ver capítulo 4.2.5.), siendo más generalizadas en estadios avanzados.

La legislación vigente especifica que el material biológico para el cultivo microbiológico de las especies del MTBC son los nódulos linfáticos y órganos parenquimatosos con lesiones compatibles con TB, debiendo incluir también tejido sano adyacente. La presencia de estas lesiones es evaluada por veterinarios en las canales de todos los bovinos sacrificados en los mataderos oficiales, independientemente del resultado obtenido en las pruebas oficiales de diagnóstico de TB.

En estadios iniciales de la infección es posible que los granulomas aún no se hayan formado o que éstos sean de un tamaño demasiado pequeño como para ser percibidos de forma directa. En estos casos donde no se observa una lesión macroscópica, es necesario recoger al menos un nódulo linfático de los linfocentros de la cabeza, la cavidad torácica, el miembro torácico, la cavidad abdominal y la glándula mamaria, según se indica en el manual de procedimiento sanitario de

“Toma y envío de muestras para el cultivo microbiológico y diagnóstico de tuberculosis” (MAPA y VISAVET, 2017). Actualmente, para los animales procedentes de un rebaño de estatuto T3, con la calificación suspendida por la aparición de algún reaccionante positivo en espera de confirmación, es obligatorio incluir los nódulos linfáticos mesentéricos.

Las muestras biológicas deben tomarse de la forma más limpia y aséptica posible, ya que de esta forma se reducirá la presencia de microorganismos contaminantes que pudiesen competir con las micobacterias por los nutrientes del medio de cultivo. Éstas deben de mantenerse refrigeradas a 4 °C tras su recogida y durante el transporte al laboratorio, por un tiempo máximo de 36 h, para garantizar la conservación del tejido y la viabilidad de las bacterias del MTBC, así como para evitar el crecimiento de otros microorganismos que pudiesen estar presentes. Alternativamente, y especialmente en aquellos casos en los que las muestras llegaran al laboratorio pasadas las 36 h, éstas pueden congelarse a una temperatura inferior a -20 °C (MAPA y VISAVET, 2017). Además, el transporte de las muestras se realizará siguiendo la normativa descrita en la Guía Técnica del Real Decreto 664/1997 de 12 de mayo relacionada con la exposición a Agentes Biológicos. No podemos olvidar que, según la OMS, las especies del MTBC están incluidas dentro del grupo de riesgo 3 atendiendo al riesgo de infección que dichos agentes suponen y, por lo tanto, el cultivo requiere un laboratorio con un nivel de bioseguridad equivalente (es decir, nivel de bioseguridad 3), donde se garantiza la protección del personal especializado y del medio ambiente.

Descontaminación de la muestra

Una vez las muestras llegan al laboratorio, éstas deben ser minuciosamente inspeccionadas para valorar la presencia de lesiones compatibles con TB, con el objetivo principal de detectar lesiones pequeñas que no fueron detectadas en el mataadero. A continuación, se toma una porción de cada nódulo linfático y mediante un homogeneizador de laboratorio se rompe el tejido mediante una acción mecánica para liberar a las micobacterias del MTBC del interior de los tejidos y de las células en las que se encuentran. Esta etapa de homogeneización puede afectar a la viabilidad de las micobacterias y a la cantidad de bacterias disponibles, por lo que el homogeneizador y los parámetros empleados deben estar perfectamente controlados.

Como se ha comentado previamente, las micobacterias del MTBC se caracterizan por su crecimiento lento, pudiendo tardar hasta tres meses en formar colonias en un medio de cultivo sólido. Además, son bacterias con unos requisitos nutricionales elevados, lo cual requiere del uso de medios de cultivos muy ricos en nutrientes. Por esta razón, la presencia en la muestra de otros microorganismos de crecimiento más rápido y con requerimientos nutricionales menos exigentes podrían enmascarar el crecimiento de las especies del MTBC, al producirse una

competición directa por los nutrientes del medio. Aunque los medios de cultivo suelen incluir componentes antimicrobianos, como el colorante verde malaquita en algunos medios sólidos o antibióticos en los medios líquidos, éstos no siempre son efectivos, ya que dependen de la carga inicial de microorganismos contaminantes de la muestra. Por esta razón, para evitar el crecimiento de otras bacterias no deseadas, los tejidos deben de ser descontaminados antes de la siembra en sus respectivos medios de cultivo. Este procedimiento es especialmente importante en aquellas muestras que presentan un elevado riesgo de contaminación, como pueden ser muestras procedentes de animales silvestres, que no se han conservado de forma adecuada o nódulos linfáticos mesentéricos.

Existen diversos agentes descontaminantes que pueden emplearse para el aislamiento de micobacterias del MTBC, como el cloruro de hexadecilpiridinio (HPC), el hidróxido de sodio (NaOH) o el ácido oxálico, entre otros. La robusta pared celular de las micobacterias les permite resistir, en cierta medida, la agresividad de estos compuestos químicos, aunque se conoce que la descontaminación siempre viene asociada a una pérdida de viabilidad directamente relacionada con la concentración de descontaminante y el tiempo de incubación empleado (Corner y Trajstman, 1988; Corner et al., 1995). Por lo tanto, en el laboratorio se establecen las condiciones óptimas que garantizan la eliminación del mayor número de microorganismos contaminantes sin afectar a la viabilidad de las micobacterias. Además de estas bacterias contaminantes, hay que tener en cuenta que existen otras bacterias, incluyendo otras micobacterias no tuberculosas, que pueden sobrevivir a la descontaminación de la misma manera que las especies del MTBC, como pueden ser micobacterias del MAC, otras micobacterias ambientales, u otros géneros bacterianos como *Rhodococcus*. En ocasiones, estos géneros pueden dar lugar a granulomas similares a los producidos por MTBC, e incluso estar produciendo una coinfección en el animal junto a las micobacterias del MTBC. En un estudio realizado en Francia en muestras de bovino con resultados de histopatología positiva pero PCR a MTBC negativa (n=292) entre los años 2013-2016, identificaron mediante PCR directa micobacterias atípicas en el 24% de las muestras (principalmente MAA y *M. nonchromogenicum*) y Actinomycetales en el 56% (principalmente *Rhodococcus equi*) (Michelet et al., 2018).

Tras la descontaminación de la muestra y la neutralización del agente químico (si se requiere), se concentran y recuperan las micobacterias mediante un proceso de centrifugación, y se prepara el sedimento para su siembra en medios de cultivo específicos.

Inoculación del medio de cultivo e incubación

Los medios de cultivo pueden dividirse en dos grupos principales: los medios sólidos y los medios líquidos. Los medios sólidos pueden subdividirse a su vez en

medios basados en agar, como el Middlebrook, o con base de yema de huevo como el Löwenstein-Jensen con piruvato de sodio, Coletsos o Stonebrink (Figura 32A). En el caso de los medios líquidos no existe una variedad tan elevada de medios de cultivo, siendo el más empleado el medio MGIT™ (del inglés *Mycobacteria Growth Indicator Tubes*) para la plataforma automatizada BACTEC™ MGIT™ 960 (Figuras 32B y 32C).

El crecimiento óptimo de *M. bovis*/*M. caprae* se produce a 37 °C y se evalúa de forma continua, pero distinta, en los medios sólidos y los líquidos. En el caso de los medios sólidos el crecimiento se hace visible a través de la formación de colonias blanquecinas más o menos abundantes y separadas (Figura 33), o a través de la aparición de una capa homogénea de bacterias (crecimiento confluyente). La detección del crecimiento en un medio líquido se observa como turbidez o pequeñas agrupaciones de bacterias en el medio. En general, si se usa un sistema de lectura automatizado, el equipo informa sobre el crecimiento en el medio de forma indirecta al detectar fluorescencia en los tubos, que es empleada como indicador del consumo de oxígeno y, por lo tanto, del crecimiento microbiano.

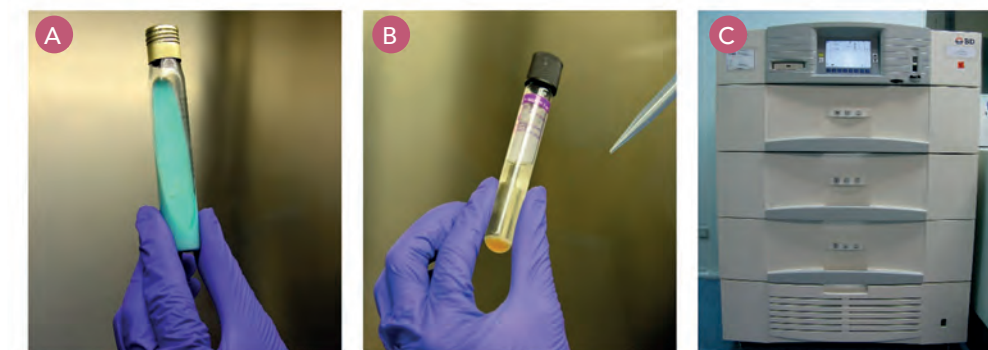


Figura 32. Tipos de medios de cultivo.

- A) Cultivo sólido Löwenstein-Jensen con piruvato sódico. B) Cultivo líquido MGIT™.
C) Plataforma automatizada de cultivo líquido BACTEC™ MGIT™ 960.

La capacidad de aislamiento y el tiempo requerido para detectar el crecimiento microbiano varía entre los distintos medios de cultivo y depende en gran medida de la cantidad de bacterias en el tejido de partida (Corner et al., 2012), siendo más probable obtener un cultivo positivo a MTBC en tejidos con lesiones compatibles con TB. Según datos obtenidos en el Centro VISAVET, en muestras de bovino procedentes del programa de erradicación de TB procesadas en los años 2012-2013, se aisló MTBC en medios de cultivo sólidos en un 82,5% de las muestras con presencia de lesiones compatibles con TB frente al 6,5% en muestras sin

lesiones visibles (Tabla 8). Por lo general, el medio líquido es mucho más rápido aislando micobacterias que el cultivo sólido, con una media de 2 semanas para el MGIT, frente a las 3-4 semanas del Middlebrook 7H11P (Robbe-Austerman et al., 2013; Yates et al., 2017), razón por la cual es empleado en numerosos laboratorios nacionales e internacionales. Como se observa en la Tabla 8, estos datos también se han corroborado en España, detectando crecimiento de MTBC en medio de cultivo sólido en el 51% de las muestras con lesiones compatibles con TB en menos de 4 semanas (Tabla 8).



Figura 33. Aislados bacterianos obtenidos mediante cultivo sólido.

- A) Colonias compatibles con micobacterias del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC). B) Crecimiento confluyente compatible con micobacterias del MTBC. C) Colonias no compatibles con micobacterias del MTBC (micobacterias atípicas).

Entre los medios sólidos, los que tienen una base de huevo dan lugar a un mayor crecimiento y a un mayor número de muestras positivas, pero las colonias aparecen más tarde que en los medios basados en agar (Corner et al., 2012), por lo que se recomienda el uso simultáneo de ambos tipos de medio (Krasnow y Wayne, 1969; Corner et al., 2012). El tiempo requerido para considerar un cultivo microbiológico como negativo varía en la literatura científica (Hines et al., 2006; Corner et al., 2012; Robbe-Austerman et al., 2013; Yates et al., 2017), pero para garantizar el mayor número de aislamientos se recomienda un tiempo máximo de 42 días para el sistema líquido automatizado MGIT (Becton-Dickinson, Estados Unidos) y de 90 días para el cultivo sólido (Corner et al., 2012). Cumplir estos plazos es especialmente importante si se están analizando muestras sin lesiones visibles compatibles con TB, pues es en estos casos donde la carga bacteriana es menor y donde se requieren mayores tiempos de incubación. Como ejemplo, se puede observar que usando medios de cultivo sólidos el tiempo que se tarda en obtener aproximadamente un porcentaje similar de cultivos positivos a MTBC en muestras con y sin lesiones compatibles supone una diferencia de 2-3 semanas adicionales (Tabla 8).

Tabla 8. Comparativa del número y porcentaje de muestras positivas al cultivo microbiológico en medio sólido (Löwenstein-Jensen con piruvato sódico y Coletsos) entre muestras con y sin lesiones compatibles con tuberculosis (TB), a distintos tiempos de incubación. Las muestras se procesaron en el Centro VISAVET en 2012-2013, estando todas ellas incluidas dentro del Programa nacional de erradicación de la TB.

N° muestras lesión +	N° muestras cultivo + MTBC (%)	Semanas	N° C+	%	% muestras cultivo MTBC +				
490	404 (82,5%)	≤ 2	0	0,0	51,0	92,8	97,0	98,3	99,3
		≤ 4	206	51,0					
		≤ 6	169	41,8	100,0				
		≤ 8	17	4,2					
		≤ 10	7	1,7					
		≤ 12	2	0,5					
		> 12	3	0,7					

N° muestras lesión -	N° muestras cultivo + MTBC (%)	Semanas	N° C+	%	% muestras cultivo MTBC +				
934	61 (6,5%)	≤ 2	0	0,0	9,8	67,2	88,5	95,1	98,4
		≤ 4	6	9,8					
		≤ 6	35	57,4	100,0				
		≤ 8	13	21,3					
		≤ 10	4	6,6					
		≤ 12	2	3,3					
		> 12	1	1,6					

MTBC: complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

Identificación de los aislados

Una vez se han detectado colonias compatibles con micobacterias del MTBC en los medios sólidos (Figuras 33A y 33B), o se ha detectado crecimiento en el MGIT, es necesario proceder a la identificación de los aislados. Esto es imprescindible ya que morfológicamente es imposible distinguir entre las especies del MTBC e incluso entre algunas micobacterias no tuberculosas. Por esta razón se han desarrollado técnicas moleculares como la PCR, capaz de detectar variaciones genéticas entre las micobacterias del MTBC y otras micobacterias no

tuberculosas, e incluso variaciones entre las especies que componen el MTBC. De esta forma, se puede establecer si el crecimiento corresponde con micobacterias del MTBC, si se trata de micobacterias no tuberculosas o si se trata de otro microorganismo. Una información más detallada sobre estas metodologías está disponible en el capítulo 4.2.6. de este libro.

Interpretación de un informe microbiológico y conceptos a tener en cuenta

Una vez se identifican a los microorganismos que han crecido en la muestra se procede a la realización de un informe microbiológico donde se realiza la interpretación de los resultados. Tras enumerar las distintas etapas del procedimiento del cultivo microbiológico y la diversidad de factores que influyen en su eficiencia, es comprensible que la interpretación de un informe microbiológico no sea tan sencilla. Las distintas opciones que se pueden presentar en un informe son las siguientes:

- 1) Cultivo positivo (presencia de crecimiento) – PCR MTBC positiva. Se detecta crecimiento microbiano en los medios de cultivo y mediante PCR se identifica el crecimiento de bacterias del MTBC o a nivel de especie (ejemplo, *M. bovis*). El resultado final es POSITIVO a MTBC o *M. bovis*.
- 2) Cultivo negativo (ausencia de crecimiento). No se detecta crecimiento microbiano en los medios de cultivo y, por lo tanto, no se realiza ninguna PCR de identificación. El resultado final es NEGATIVO a MTBC.
- 3) Cultivo positivo (presencia de crecimiento) – PCR MTBC negativa. Se detecta crecimiento microbiano en los medios de cultivo y mediante PCR no se identifica el crecimiento de bacterias del MTBC o a nivel de especie (ejemplo, *M. bovis*). El resultado final es NEGATIVO a MTBC o *M. bovis*.

En ocasiones, tanto ganaderos como veterinarios preguntan por qué se obtienen resultados negativos [opción 2) y 3)] de animales marcados como positivos a IDTB y/o a la técnica de IFN- γ , en los que tras el sacrificio no se observan lesiones en matadero. En base a todo lo que se ha comentado previamente en relación al cultivo de micobacterias, no puede descartarse que el animal esté realmente infectado debido a que la Se de esta técnica depende de muchos factores (Roy et al., 2017; Sáez Llorente et al., 2017):

- a) Que el muestreo no haya sido completo, por lo que la lesión podría localizarse en un órgano o parte de un órgano no analizado;
- b) Que la lesión sea microscópica, siendo ésto más frecuente en aquellos animales detectados en fases tempranas de la infección, especialmente si se ha empleado la técnica de IFN- γ ;

- c) Que las muestras estén muy mineralizadas y, por lo tanto, ya no contengan bacterias viables o tengan una carga bacteriana insuficiente, impidiendo el aislamiento;
- d) Que la conservación y transporte de la muestra no se haya realizado de forma adecuada y la presencia de otras bacterias contaminantes impida el crecimiento de las bacterias del MTBC; o
- e) Que se trate de un falso positivo, causado por ejemplo por otras micobacterias no tuberculosas. En este último supuesto los cultivos presentarían crecimiento, pero serían negativos a MTBC, donde se recomendaría realizar una identificación de las bacterias en crecimiento.

En definitiva, el cultivo microbiológico es una técnica oficial de diagnóstico de la TB que corrobora la infección por las especies del MTBC en el animal. Sin embargo, el éxito de la técnica depende de múltiples factores que afectan a la recuperación de las micobacterias en el laboratorio y, por lo tanto, la interpretación de los informes debe hacerse teniendo en cuenta estas limitaciones. Además, el cultivo es necesario para obtener los aislados microbianos con los que realizar la caracterización genética, que es fundamental para llevar a cabo los estudios epidemiológicos de esta enfermedad. Por todo ello, el cultivo microbiológico sigue teniendo un papel clave en la erradicación de la TB.

4.3. Los hospedadores

4.3.1. El reservorio bovino

Joséba Garrido, M^o Ángeles Riscalde, Jordi Casal, Iker A. Sevilla

La TB animal sigue siendo un problema importante en muchos países. Los esfuerzos para erradicar esta enfermedad se han centrado en el ganado bovino, ya que se considera el reservorio principal de la misma (Cousins, 2001). Sin embargo, la infección se ha establecido en otras especies, sobre todo en las silvestres y, en la actualidad, estos hospedadores están siendo los encargados de mantener la infección en determinados territorios. A pesar de tratarse de una enfermedad zoonótica, actualmente el riesgo para la salud humana es muy reducido gracias a los buenos resultados de los programas de erradicación y a la efectividad de los tratamientos térmicos empleados en el procesado de la leche, pero aun así, el 0,4% de las TB humanas a nivel mundial son debidas a *M. bovis* (EFSA y ECDC, 2019), aunque no es posible concretar la fuente de contagio (ver capítulo 3).

El programa de erradicación

Los primeros pasos en la lucha contra la TB bovina a nivel estatal se dieron en la década de los 50 en Cantabria y en Bizkaia de la mano de D. Jesús Cuezva Samaniego utilizando la prueba IDTB. Tuvo continuidad en Bizkaia, pero hasta 1955 la campaña fue de carácter voluntario y no se procedió al sacrificio obligatorio de los animales reaccionantes. Los resultados correspondientes a los tres primeros años fueron publicados en un libro titulado "Las campañas contra tuberculosis bovina en Vizcaya" (Cuezva-Samaniego, 1954). Ya en 1965 se estableció un Plan Nacional de Lucha contra la TB y la brucelosis bovinas, centrado sobre todo en los principales núcleos de vacuno lechero del norte y centro del estado. Tras la entrada en la CEE, en 1987 España presentó un Programa de Erradicación Acelerada que permitió una reducción importante de la prevalencia en esta especie. Sin embargo, el punto de inflexión fue el Programa Nacional de Erradicación de la Tuberculosis Bovina 2006-2010, ya que supuso un cambio cualitativo en el planteamiento de los objetivos, de forma que se sentaron las bases para garantizar actuaciones continuadas en el tiempo bajo un enfoque plurianual.

El objetivo principal del Programa es la erradicación de la enfermedad y la población diana son todos los bovinos. Solo pueden quedar excluidas del Programa las explotaciones de cebo ubicadas en provincias, comarcas o unidades veterinarias locales (o municipios, en su caso) cuya prevalencia no sea cero, siempre que sean unidades de cebo puras, explotadas en condiciones cerradas de forma que no supongan ningún riesgo de diseminación de la enfermedad. Sin embargo, a pesar de seguir un Programa común, la situación en España es muy dispar, con prevalencias a nivel de rebaño, según datos de 2018, que superan el 20% en Castilla-La Mancha, mientras que hay ocho comunidades autónomas por debajo del 0,5%. En estos momentos Canarias es la única comunidad que se considera oficialmente libre de TB en su totalidad, así como la provincia de Pontevedra en Galicia, que también ha conseguido alcanzar esta calificación. Se trata de un reto realmente exigente, ya que supone tener una prevalencia a nivel de rebaño menor o igual al 0,1% durante seis años consecutivos.

Las explotaciones de bovino se clasifican en relación al programa en tres tipos: ganado de lidia, ganado de carne y ganado de leche, con tres situaciones bien diferenciadas. La prevalencia media a nivel de rebaño para estos grupos en 2018 fue de 8,66%, 2,40% y 1,05%, respectivamente. Esto se asocia con el tipo de manejo; mientras que las explotaciones de leche están sometidas a una producción intensiva, si bien es cierto que en muchas de ellas la recría se maneja de forma semiextensiva hasta unas semanas antes del primer parto, el ganado de carne y lidia siguen un manejo extensivo. Esto hace que la interacción con la fauna silvestre sea frecuente y en las comunidades con alta prevalencia de TB en jabalí y ciervo, estas especies supongan un grave problema para la erradicación

de la misma en el ganado bovino. Por esta razón, tal y como se puede ver en los mapas epidemiológicos de la enfermedad, en el cuadrante sur-occidental de España, coincidiendo con una mayor densidad de fauna silvestre y explotaciones de ganado de lidia y de carne, se dan las prevalencias más altas. Por otro lado, tampoco hay que olvidar la dificultad que supone la realización de las pruebas intradérmicas en el ganado de carne y de lidia. Las condiciones de manejo en mangas y el carácter más agresivo de los animales hacen que la medida del grosor de la piel antes y después de la IDTB no siempre pueda hacerse con la misma precisión que en el ganado de leche, más habituado al contacto tanto con el ganadero como con el veterinario.

Un dato positivo es el relativo a la incidencia a nivel de rebaño que es del 1,36%; con una disminución entre 2016 y 2017 del 27,5%, aunque en 2018 se observó un incremento a nivel general del 17% influenciado por el aumento de casos observado en Castilla-La Mancha.

El Programa de erradicación de la TB, centrado principalmente en la especie bovina, es de los programas sanitarios que más recursos consume, tanto en España como en la UE. España en el año 2018 invirtió en este Programa 36,6 millones de euros, de los cuales la UE financió 14,24 millones. Del coste total, el 38,7% se destinó a indemnizar el sacrificio de 31.132 animales de las especies bovina y caprina. Más concretamente, del total de sacrificios, 21.437 fueron bovinos.

Epidemiología

Durante mucho tiempo se pensó que la transmisión de micobacterias del MTBC se producía exclusivamente por vía aerógena, pero se ha observado que la vía digestiva también juega un papel importante en su transmisión, aunque se trata de una vía menos eficiente (Domingo et al., 2014). Los animales infectados pueden excretar micobacterias, principalmente por vía aerógena, y quedar éstas depositadas en comederos y bebederos naturales o artificiales a los que tendrán acceso otros animales (Figura 34). Una de las particularidades que tienen las micobacterias, incluidas las pertenecientes al MTBC, es la estructura de su pared. Se trata de una pared compleja que incluye una doble capa lipídica que confiere gran resistencia a la bacteria. Además, tanto *M. bovis* como *M. caprae*, las principales micobacterias causantes de la TB animal, son de crecimiento lento, lo que combinado con la resistencia de su pared les permite mantenerse viables durante largos periodos de tiempo. Todo esto facilita la transmisión de la bacteria entre animales de la misma o distinta especie, lo que hace que haya que ser muy estricto en la aplicación de las medidas de bioseguridad. Otras vías de infección como la genital, la intramamaria o la transplacentaria también han sido descritas, pero en los países que están llevando planes de erradicación son muy inusuales debido a la situación epidemiológica actual.



Figura 34. Bebedero natural compartido por varias especies.

En las condiciones actuales, debido a la campaña de erradicación y al largo periodo de incubación de la micobacteria, la TB no es una enfermedad especialmente contagiosa. En un estudio realizado recientemente (Ciaravino et al., 2018) se calculó el número de animales que se habían infectado a partir de un animal infeccioso (conocido como tasa de reproducción o R_0). A partir de los datos de 22 rebaños de distintas zonas de España, si se analizan los animales cada 6 meses, un animal infectado contagiará a una media de 0,23 animales (entre 0 y 2 para un nivel de confianza del 95%). Si los controles se realizan cada año o cada dos años, la media de la transmisión aumentará a 0,82 y 2,01, respectivamente, con un valor mínimo de 0 en ambos casos y un máximo de 3 y 6, respectivamente, para dicho nivel de confianza.

Patogenia

El conocimiento de la patogenia y de las lesiones de la TB es un punto importante para la identificación de los animales y de los rebaños infectados. La nomenclatura de los diferentes estadios de infección y de las formas lesionales se ha ido simplificando con el paso del tiempo.

La vía de infección se ha visto que juega un papel importante, tanto en el tiempo necesario para que se produzca la respuesta inmune celular y la

aparición de las lesiones, como en la distribución de estas últimas. Tal y como se ha mencionado anteriormente, lo más aceptado hasta el momento es que la vía inhalatoria es la principal vía de transmisión del agente etiológico. Sin embargo, hay que tener en cuenta un estudio llevado a cabo sobre un número reducido de terneros en el cual se asoció la infección por vía oral con un retraso en el tiempo de respuesta a las pruebas de diagnóstico *in vivo*, con un desarrollo más lento de las lesiones y con una localización principalmente en la región abdominal, más concretamente en los nódulos linfáticos yeyunales (Serrano et al., 2018). Esto puede tener implicaciones tanto para el diagnóstico *in vivo* y la confirmación de los reaccionantes, como para la inspección *post mortem* de los animales.

En cualquier caso, la patogenia de la enfermedad es compleja y también está influenciada por la virulencia de la cepa infectante, por la potencia de la respuesta inmune del animal y por los contactos previos con micobacterias. Esto implica que el tiempo que transcurre desde el momento de la infección hasta la aparición de las lesiones es muy variable.

Para que se produzca la infección las micobacterias tienen que atravesar las mucosas o los espacios alveolares, momento en el que se lleva a cabo el reconocimiento de la bacteria por parte de las células dendríticas, que son las encargadas de activar la respuesta inflamatoria. Una parte de esta respuesta inflamatoria es de tipo Th1 y los linfocitos T son capaces de producir IFN- γ y activar a los macrófagos. En ese momento las micobacterias son fagocitadas y los neutrófilos son atraídos y se acumulan en el lugar de la infección inicial (Arentz y Hawn, 2007). De esta forma quedaría formado el "foco primario" (Figura 35). A través de los vasos linfáticos la infección alcanza el nódulo linfático de drenaje y se formaría el "complejo primario completo". En el caso de no observarse la lesión inicial pero sí la del nódulo linfático regional se hablaría de "complejo primario incompleto". A partir de este punto la infección puede seguir diferentes caminos como son la curación y la latencia si los animales tienen una respuesta inmune celular potente, o la generalización precoz a través de su diseminación por vía linfohematógena. Todo este proceso estaría englobado en el denominado "periodo primario". De aquí en adelante y como resultado de una reinfección o de la exacerbación de las formas de latencia, podría darse el desarrollo de formas lesionales dentro de lo que se conoce como "periodo post-primario". Finalmente, hay quien considera que en cualquiera de los dos periodos pueden desencadenarse las "formas de ruptura". Estas formas se producen debido a una respuesta inmune ineficaz causada por deficiencias en la dieta, estrés, cambios hormonales, otras infecciones concomitantes o mayor susceptibilidad genética, entre otras.

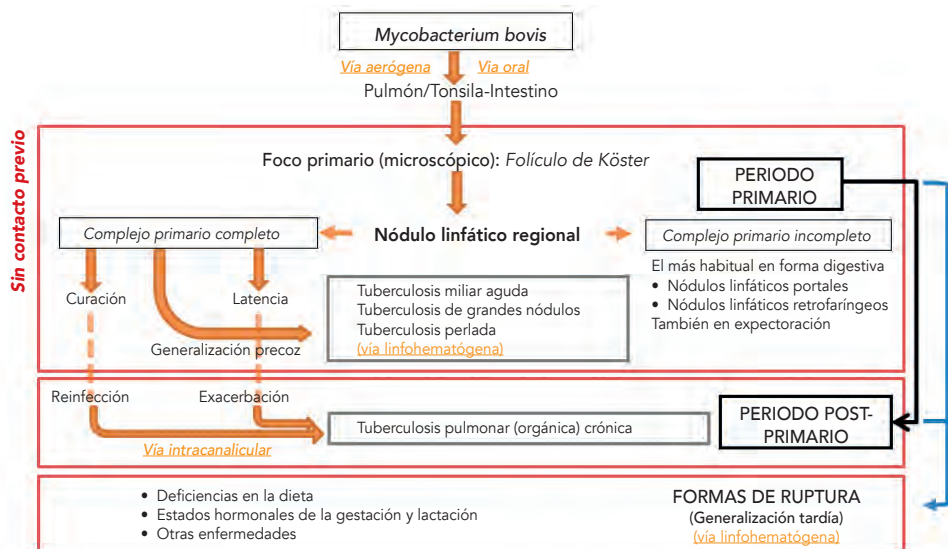


Figura 35. Desarrollo y clasificación de las lesiones en la tuberculosis bovina.

Las formas de latencia son las grandes desconocidas en la patogenia de la TB y pueden jugar un papel importante en la dinámica de la infección (Pollock y Neill, 2002) y, por tanto, en el éxito de los programas de erradicación. A nivel lesional, la TB bovina es una enfermedad caracterizada por el desarrollo progresivo de granulomas o tubérculos en el tejido afectado. Los granulomas típicos forman un nódulo de color amarillento de 2-20 mm de diámetro, encapsulado y con un centro de necrosis que puede llegar a la calcificación (Neill et al., 2001). En el capítulo 4.2.5. dedicado al diagnóstico anatomopatológico se detallan las características de los diferentes tipos lesionales.

Los signos clínicos que se observan en la TB animal son similares en todas las especies y se corresponden con debilidad, pérdida de apetito, pérdida de peso, tos seca y dificultad respiratoria en estados más avanzados, así como nódulos linfáticos aumentados de tamaño. En el ganado bovino es extremadamente inusual encontrar animales que presenten signos clínicos (Menzies y Neill, 2000; Liébana et al., 2008). Esto es debido a que las técnicas de diagnóstico *in vivo* utilizadas de forma rutinaria en los programas de erradicación de la TB bovina se basan en la detección de la respuesta inmune celular, la cual se asocia con las fases iniciales de la enfermedad. Esto implica que los animales son detectados en gran parte de las ocasiones con anterioridad a la aparición de las lesiones o cuando éstas son de tamaño tan reducido que no se consigue su identificación sin llevar a cabo un estudio extremadamente minucioso de todos los tejidos.

Diagnóstico *in vivo*

La técnica de rutina para el diagnóstico *in vivo* de la TB bovina es la IDTBs o IDTBc, complementándose estratégicamente con el uso del IFN- γ en rebaños positivos considerados infectados y, en aquellos relacionados epidemiológicamente. Estas técnicas están orientadas a la detección de la respuesta inmune celular, por lo que en determinadas circunstancias es necesario recurrir a otras técnicas capaces de detectar la respuesta inmune humoral, la cual se produce en fases más tardías de la infección en las que incluso puede haber desaparecido la respuesta celular.

La IDTB es la técnica más ampliamente utilizada en el diagnóstico *in vivo* de la TB bovina. Tal y como se ha explicado en el capítulo 4.2.1., basa su fundamento en la detección de la respuesta inmune celular, más concretamente en la hipersensibilidad de tipo retardado que se produce a nivel local, tras la aplicación intradérmica de un antígeno, en los animales sensibilizados previamente frente a este antígeno. En este caso se producirá un incremento en el grosor de la piel alcanzando su pico máximo a las 72 h tras la aplicación del antígeno. Se considera una técnica con una Sp y una Se media del 96,8% y del 83,9%, respectivamente, según una revisión de los estudios realizados al respecto (de la Rúa-Domenech et al., 2006). Este valor de Se puede estar influenciado por ciertos factores como una aplicación o medición de la reacción incorrecta, la localización del punto de aplicación, la falta de potencia o una dosis insuficiente de tuberculina, entre otros (Lepper et al., 1977; Monaghan et al., 1994). Además, hay que tener en cuenta que es posible encontrar en matadero animales con TB generalizada que no son detectados por esta técnica debido a que ya no presentan respuesta inmune celular detectable, son los denominados anérgicos (Lepper et al., 1977; Pollock y Neill, 2002). Por otra parte, la pequeña falta de Sp de la prueba puede estar influenciada por las reacciones cruzadas con otras micobacterias próximas a *M. bovis* y *M. caprae*, en muchas ocasiones pertenecientes al MAC. En estos casos, cuando encontramos explotaciones con animales reaccionantes en las que no se consigue confirmar la TB es aconsejable recurrir a la IDTBc, que, como ya se ha explicado en capítulos anteriores, consiste en la aplicación de un antígeno bovino y otro aviar para poder discernir cuál es la respuesta predominante. La IDTBc es capaz de mejorar los valores de Sp pero hay algunos estudios que señalan cierta pérdida de Se, por lo que su utilización no siempre estaría justificada y habrá que valorar la situación epidemiológica en la que se encuentre la zona.

La detección del IFN- γ *in vitro* a partir de muestras de sangre heparinizada es una técnica que fue desarrollada en Australia en los años 80. Esta técnica consta de dos fases, una primera consistente en la estimulación en placa de la sangre del animal utilizando como antígenos PPD aviar y PPD bovina. Esta

estimulación deberá hacerse en las siguientes 8 h tras la toma de la muestra ya que de no ser así, los linfocitos T, encargados de la producción del IFN- γ , habrían perdido esta capacidad en el momento de la estimulación. La segunda fase consiste en la cuantificación mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA) del IFN- γ producido. Se trata de una técnica con unos valores medios de Sp y Se del 96,6% y 87,6%, respectivamente (de la Rua-Domenech et al., 2006).

La detección de anticuerpos mediante la técnica ELISA puede ser considerada una técnica complementaria y muy recomendable cuando se detecta la TB por primera vez en una explotación. En ese momento es posible que haya animales en diferentes estadios de la infección y en algunos de ellos puede haber desaparecido la respuesta celular pero no la humoral (Welsh et al., 2005). Los valores de Se y Sp no son altos, pero su gran valor es la capacidad para detectar al menos una parte de los animales considerados anérgicos en base a la respuesta celular. El valor de esta complementariedad fue demostrada en un estudio llevado a cabo en una explotación ubicada en una región de alta prevalencia (Casal et al., 2017). En este trabajo se observó que la interpretación en paralelo de los resultados obtenidos con algunos protocolos de IFN- γ y ELISA mejoraba en al menos un 2% los valores de Se obtenidos con cualquier otra combinación. Es una técnica con margen de mejora y los estudios se centran en la búsqueda de nuevas proteínas más específicas, siendo la más reciente la P22, tal y como se ha mencionado en el capítulo 4.2.4. (Infantes-Lorenzo et al., 2017).

Erradicación de la enfermedad

En el ganado bovino, así como en el ganado de abasto en general, no se aplican tratamientos ya que el objetivo es la erradicación de la enfermedad. Esto aumentaría el riesgo de contagio durante el periodo de curación y requeriría tratamientos prolongados con antibióticos, con todo lo que ello implica. Por tanto, la erradicación de la TB bovina se debe basar en la detección y la eliminación de los animales infectados, y en la implantación de estrictas medidas de bioseguridad que eviten el contagio de los animales, tal y como se explica en el capítulo 4.4.1.

4.3.2. El caprino

Alicia Aranaz, Bernat Pérez de Val, Javier Bezos

La TB en el ganado caprino tiene graves repercusiones económicas y sanitarias. Aunque cada vez existe un mayor conocimiento sobre esta infección y el papel del ganado caprino como reservorio, la ausencia de un programa de erradicación a nivel nacional impide conocer la prevalencia real de TB y favorece la aparición o persistencia de los brotes en los rebaños. La erradicación de la enfermedad requiere el control en las diferentes especies animales que actúan como reservorios, incluyendo el ganado caprino. El diseño de los programas de erradicación debe tener en cuenta la situación epidemiológica de cada explotación (infección reciente o persistente) y el efecto de otras infecciones o vacunaciones en la elección de las pruebas de diagnóstico. El control de la infección se verá beneficiado por la investigación en la complementariedad de las pruebas de diagnóstico, las medidas de gestión más adecuadas y el desarrollo de vacunas.

Epidemiología

Los agentes etiológicos implicados, principalmente *M. bovis* y *M. caprae*, y el impacto de la enfermedad dependen de la zona geográfica. *Mycobacterium bovis* es el agente involucrado en los casos descritos en la mayoría de los países europeos, Oriente Medio, América, Australia y Nueva Zelanda, mientras que *M. caprae* está presente en países europeos mediterráneos. En España coexisten ambos patógenos (Rodríguez-Campos et al., 2012), con algunas poblaciones muy afectadas (García-Marín, 1992; Liébana et al., 1998) en comparación con la situación en otros países (Broughan et al., 2013). La infección en el ganado caprino se produce en la interfaz ganado vacuno-pequeños rumiantes-fauna silvestre. Se ha asociado con el manejo tradicional, como los rebaños mixtos, el pasto en extensivo con oportunidad para contactar con fauna silvestre, o los rebaños “comunales” que agrupan los animales durante el día (Tschopp et al., 2011); aunque este efecto puede variar entre zonas geográficas y posiblemente con la especie de micobacteria implicada.

Las cabras pueden jugar un papel en el mantenimiento y transmisión de la infección. La falta de conocimiento de la enfermedad y la ausencia de programas de control y pruebas previas al movimiento pueden resultar en la diseminación a otros rebaños (Crawshaw et al., 2008), incluso a otras especies animales. De hecho, existe infección cruzada de *M. bovis* entre ganado bovino y caprino (Cadmus et al., 2009), confirmada por epidemiología molecular (Zanardi et al., 2013). A su vez el ganado caprino representa una fuente de infección de *M. caprae* para el bovino (Napp et al., 2013), no solo en estos rebaños mixtos, si no también para rebaños colindantes. También está descrita la infección cruzada entre ganado caprino y ovino (Vidal et al., 2018).

Patología

La ruta de infección, la localización de las lesiones y su aspecto macroscópico son análogos a lo descrito para el ganado bovino; sin embargo, suelen presentar una mayor extensión (Liébana et al., 1998; Daniel et al., 2009). Las lesiones producidas por *M. bovis* o *M. caprae* son similares (Álvarez et al., 2008; Bezos et al., 2010; Pérez de Val et al., 2011). La patología en el caprino parece ser más grave que la inducida en el bovino; varios estudios describen una amplia diseminación de la infección en el rebaño, con presencia de lesiones diseminadas en un gran número de animales (Crawshaw et al., 2008; Napp et al., 2013; Zanardi et al., 2013). Este escenario puede ser compatible con una mayor gravedad de la TB en esta especie, pero también con estadíos avanzados de la infección, si ésta no es detectada por falta de aplicación de pruebas de diagnóstico.

Los animales enfermos muestran las lesiones inflamatorias granulomatosas crónicas características de la infección en diferentes estadíos de evolución (Bernabé et al., 1991). Las necropsias revelan lesiones granulomatosas, caseosas, o caseocalcificadas de diferentes tamaños en el tracto respiratorio (pulmón y nódulos linfáticos), pleura, hígado, y nódulos linfáticos mesentéricos (Liébana et al., 1998). Las lesiones caseosas típicas en los nódulos linfáticos pueden variar desde puntuales a grandes lesiones (Daniel et al., 2009). En estadíos avanzados los animales llegan a presentar grandes áreas de cavitación (cavernas) en el pulmón (Figura 36). Estas lesiones cavitarias presentan condiciones óptimas para el crecimiento de las micobacterias; además, la necrosis y la licuefacción facilitan el escape de las micobacterias a las vías aéreas, con mayor potencial de diseminación por aerosoles (Daniel et al., 2009). Las lesiones pueden estar también presentes en la ubre (Crawshaw et al., 2008).



Figura 36. Lesiones tuberculosas en caprino. Lesiones granulomatosas y caseosas multifocales, que llegan a ocupar todo el parénquima pulmonar. Las lesiones más avanzadas forman cavernas; estas lesiones están asociadas a una mayor transmisión de la infección.

Microscópicamente, los granulomas proliferativos muestran caseificación y calcificación central rodeados de tejido de granulación específico y de tejido conectivo. Existen varias descripciones detalladas de las lesiones macroscópicas y de los tipos de lesiones microscópicas (Bernabé et al., 1991; Gutiérrez-Cancela y García-Marín, 1993; Sánchez et al., 2011; Buendía et al., 2013).

Diagnóstico

Diagnóstico clínico

El diagnóstico clínico de la TB en el ganado caprino presenta las mismas limitaciones que en el vacuno y otras especies. La pérdida de peso y de producción lechera y la dificultad respiratoria no son específicas y pueden no alertar a los veterinarios respecto a la posibilidad de presencia de la infección (Bernabé et al., 1991; Daniel et al., 2009; Quintas et al., 2010). En estadios más avanzados, la infección conduce a una emaciación progresiva, a una tos crónica y a una alta tasa de mortalidad en los rebaños.

Pruebas de diagnóstico basadas en la respuesta inmune de base celular

La respuesta inmune de base celular es esencial frente a esta infección y, por lo tanto, es la base de las pruebas de diagnóstico *ante mortem* más utilizadas. Estas pruebas utilizan los mismos métodos que los aplicados en el ganado bovino: las pruebas IDTBs e IDTBc, y la prueba de IFN- γ . La base biológica, los procedimientos, los reactivos, las dosis, y los criterios de interpretación siguen habitualmente los mismos principios descritos en el manual de la OIE (2018) o las directrices de la Directiva Europea 64/432/EEC (Comisión Europea) para la detección de la infección en el ganado vacuno.

Las pruebas de IDTB muestran amplias diferencias de Se, con extremos entre el 30 y 100% (Bezós et al., 2011b), pudiendo depender de factores técnicos, pero sobre todo, de la situación de cada rebaño. Los resultados deben ser interpretados utilizando los criterios estrictos que se utilizan en bovino, especialmente en los rebaños en los que se haya confirmado la infección o en rebaños con vínculos epidemiológicos con otros confirmados (Shanahan et al., 2011). En general, la IDTBc obtiene resultados pobres en situaciones epidemiológicas que implican una infección persistente con *M. caprae*; en estas situaciones es conveniente utilizar la IDTBs y pruebas complementarias que mejoren la posibilidad de detección de animales infectados (Buendía et al., 2013; Bezós et al., 2018).

La prueba de IFN- γ ha sido utilizada para el diagnóstico de la TB en caprino utilizando el protocolo, los kits y los puntos de corte que se aplican en el bovino. La prueba de IFN- γ no se incluye como prueba rutinaria en los programas de erradicación en ganado caprino, aunque se ha utilizado como prueba

complementaria en determinadas situaciones epidemiológicas y en estudios experimentales. La Se obtenida en los estudios también es variable, entre el 67,9% (Zanardi et al., 2013) y el 87,2% (Liébana et al., 1998). Es importante destacar que un porcentaje de los reactores aviares en la prueba pueden también dar un resultado positivo con PPD bovina; una posible explicación sería la coinfección con *M. avium* (Liébana et al., 1998).

La respuesta a la prueba de IFN- γ puede ser detectada a partir de las 2-4 semanas, con un pico que varía entre las 2 y 8 semanas tras la infección; las respuestas muestran variabilidad individual y fluctúan en el tiempo (Bezós et al., 2010; Pérez de Val et al., 2011). Los resultados a la prueba se ven afectados de forma crítica por el tiempo que transcurre entre la toma de muestras y la estimulación de la sangre en el laboratorio (mejores resultados cuando es inferior a 8 h), lo que afecta a la logística y obliga a una coordinación entre equipos de campo y laboratorio (Bezós et al., 2011a).

Varios estudios de campo han comparado la Se y la Sp de las pruebas de diagnóstico en rebaños de caprino; estos estudios ofrecen desiguales resultados, probablemente reflejo de las diferentes situaciones epidemiológicas en las que se han llevado a cabo. En general, la prueba de IFN- γ presenta mayor Se que las pruebas de IDTB y permite una detección más temprana (Tabla 9). La Se relativa de las pruebas de diagnóstico de base celular depende de la situación epidemiológica del rebaño, de la raza, de la cepa bacteriana involucrada en el brote, y del tiempo transcurrido desde la infección (Bezós et al., 2011b).

El resultado de estas pruebas puede estar condicionado por el grado de patología, ya que existe una correlación entre la patología encontrada *post mortem* y la respuesta inmune de los animales. La Se de la IDTB es inferior en cabras con lesiones avanzadas (lesiones cavitadas) o lesiones múltiples frente a cabras con menores lesiones o lesiones únicas (Gutiérrez et al., 1998; Buendía et al., 2013). En relación con la prueba de IFN- γ , existe una correlación positiva entre la patología y el resultado de la prueba (Bezós et al., 2010; Pérez de Val et al., 2011, 2013), pero a partir de un punto de progresión de la infección esta respuesta inmune también decrece.

Al igual que lo descrito para el ganado bovino, existe una concordancia baja-moderada entre los resultados de las pruebas de IDTB y la prueba de IFN- γ ; lo que significa que ambas detectan diferentes poblaciones de animales infectados (Álvarez et al., 2008). Este hecho puede aprovecharse para maximizar la Se combinando ambos resultados aplicando ambas pruebas "en paralelo" (considerando un animal positivo cuando es reactor a una u otra prueba). La combinación de resultados de la prueba IDTBs o IDTBc con la prueba de IFN- γ puede alcanzar una Se del 90,8% (Álvarez et al., 2008) o del 95,8% de cabras infectadas (Gutiérrez et al., 1998), con un éxito ligeramente inferior (78,2%) en caso de infecciones persistentes (Buendía et al., 2013).

Ciertos antígenos específicos, como el antígeno de secreción temprana 6 kDa (early secretory antigenic target 6 kDa, ESAT-6), proteína filtrada de cultivo-10 (culture-filtrate protein-10, CFP-10) y Rv3615c han sido evaluados para el diagnóstico de la infección en caprino. La Se obtenida con un cóctel de péptidos de ESAT-6/CFP-10 en la prueba de IFN- γ fue del 72,4%, ligeramente inferior al 77,7% obtenido con PPD bovina (Bezós et al., 2011b). En un modelo de infección experimental, los cócteles de péptidos ESAT-6/CFP-10 y Rv3615c mostraron una cinética similar, aunque más débil, que la respuesta frente a PPD (Pérez de Val et al., 2011, 2013).

Tabla 9. Resultados de sensibilidad (Se) de las pruebas de base celular para el diagnóstico de la tuberculosis en caprino en estudios realizados en España.

Estudio	IDTBs	IDTBc	IFN- γ	Patógeno	Observaciones
Gutiérrez et al., 1998		83,7%	83,7%		
Liébana et al., 1998	44,6% (53,2% con inconclusos)	-	87,2% (repetida)	<i>M. bovis</i> (<i>M. caprae</i>)	Infección persistente, avian
Álvarez et al., 2008	71%	42,7%	71%	<i>M. caprae</i>	Rebaño coinfectado con paratuberculosis
Bezós et al., 2011b	57,9-71,1%	44,7-68,4%	77,7%	<i>M. caprae</i>	Tres rebaños
Bezós et al., 2012b	53,2-71%	29,2-83,7%	71-87,2%		Revisión de bibliografía
Buendía et al., 2013	-	44,5%	65,3%	<i>M. caprae</i>	Infección persistente
Bezós et al., 2018	85,7%	83,3%	50,8%	<i>M. caprae</i>	

IDTBs: Intradermotuberculinización simple; IDTBc: Intradermotuberculinización comparada; IFN- γ : Prueba de detección de interferón-gamma.

Respecto a la Sp, un estudio en rebaños oficialmente libres de infección mostró una alta Sp para la IDTBs (93-96% y 97,6-99,2% utilizando la interpretación estricta y estándar, respectivamente), para la IDTBc (99,4-100% y 99,6-100%, según la interpretación) y para el IFN- γ (95,1-97,5% y 96,4-98,4% utilizando 0,05 y 0,1 de punto de corte, respectivamente) (Bezós et al., 2012a).

Algunas circunstancias epidemiológicas relativamente frecuentes en los rebaños de ganado caprino pueden tener un impacto perjudicial en el rendimiento de las pruebas de diagnóstico; las más importantes son la PTB y la pseudotuberculosis

(linfadenitis caseosa). La co-infección de TB y PTB puede interferir en el diagnóstico de la TB, afectando sobre todo a la Se de las pruebas de IDTB (Álvarez et al., 2008; Bezos et al., 2010). La vacunación frente a la PTB también puede interferir en los resultados de las pruebas de diagnóstico, alterando la Sp de la IDTB y de la prueba de IFN- γ (Aranaz et al., 2000; Roy et al., 2018a); siendo éste un asunto controvertido que continúa en estudio.

Pruebas de diagnóstico basadas en la respuesta inmune de base humoral

La existencia de una proporción de animales que no reaccionan a las pruebas de base celular (“anérgicos”) refuerza la necesidad de utilizar pruebas basadas en la respuesta inmune de base humoral, es decir, en la detección de anticuerpos, para maximizar así la detección de animales infectados. Estas pruebas serológicas pueden complementar, e incluso en determinadas situaciones podrían sustituir, a las pruebas de base celular. Además, podría utilizarse la mayor Se del ELISA anamnésico (*boosting*), que consiste en la detección de anticuerpos mediante ELISA tomando la muestra de sangre después (aproximadamente 15 días) de la aplicación de la IDTB, obteniendo una Se que supera a otras pruebas de diagnóstico (Gutiérrez et al., 1998; Bezos et al., 2018).

Los valores de Se obtenidos con las pruebas serológicas pueden estar originados por una respuesta inmune diferente en esta especie animal, o por el estado avanzado de infección de los animales de estos estudios. De hecho, un estudio en cabras infectadas por *M. caprae*, ha mostrado que la Se en animales con lesiones múltiples (89,4%) es mayor que en cabras con lesiones únicas (50,8%); una relación inversa a la obtenida con la IDTB (Buendía et al., 2013).

Medidas de control

La TB caprina no está incluida en los programas nacionales de erradicación oficiales excepto cuando los animales conviven con ganado bovino infectado o se sospecha de una relación epidemiológica. El Programa nacional de erradicación de TB (MAPA, 2019c, 2020) solamente tiene en cuenta el papel de esta especie como reservorio de *M. bovis* y *M. caprae*. El Programa incluye “los rebaños de ganado caprino que conviven o aprovechan pastos comunes o mantienen una relación epidemiológica con rebaños de bovino”. La relación epidemiológica abarca también casos de rebaños de caprino ubicados en municipios donde se haya confirmado la enfermedad en el ganado bovino. Así mismo se puede actuar en rebaños que se detecten mediante encuesta epidemiológica y/o la base de espoligotipos (caracterización molecular) que detecte cepas compartidas entre bovino y caprino como fuentes de la enfermedad para los rebaños de bovino en el mismo área. Las pruebas que se utilizan son la IDTBs o la IDTBc, pudiendo

aplicar adicionalmente la prueba de IFN- γ . Los animales positivos serán sacrificados e indemnizados según baremo (MAPA, 2020).

En varias Comunidades Autónomas existen, desde hace años, planes de actuación que se han concretado en programas de control de TB específicos del ganado caprino, cuyo objetivo es reducir la prevalencia de la infección mediante la aplicación de pruebas de diagnóstico (IDTBs o IDTBc), con carácter voluntario en algunas, y mediante medidas como el sacrificio de los animales infectados y el control de movimientos. Estos programas aportan un control sanitario de gran relevancia.

La sospecha de esta infección debe presentarse cuando existe una enfermedad respiratoria crónica, y es necesario realizar un completo estudio *post mortem* de los animales muertos en la explotación, que incluya los órganos principales, las serosas, los nódulos linfáticos torácicos, mandibulares, retrofaríngeos y portales. La detección de lesiones compatibles con la infección en el matadero es también esencial porque permite identificar animales que hayan escapado a las pruebas de diagnóstico (Álvarez et al., 2008). Un muestreo completo incrementa el éxito del aislamiento microbiológico, lo que permitirá caracterizar la cepa involucrada. Una vez que la infección se confirma, las autoridades sanitarias deben establecer una investigación epidemiológica con rastreos retrospectivo y prospectivo, y ampliar esta investigación también a los contactos y ganaderías colindantes (Daniel et al., 2009). Los incentivos para la aplicación de técnicas de diagnóstico contribuyen a la detección de la infección y a un mejor conocimiento de la prevalencia.

La erradicación de la infección en el rebaño se basa en la detección temprana de los animales infectados. Esta detección puede realizarse mediante una prueba o mediante una combinación de pruebas de diagnóstico. Cuando la prevalencia en el rebaño es alta es necesario aplicar rondas sucesivas de pruebas (Vidal et al., 1995; Liébana et al., 1998; Shanahan et al., 2011); sin embargo, el éxito va a depender fundamentalmente de la progresión de la infección en el rebaño. Esta progresión suele depender del tiempo desde la introducción de la infección en la población y de factores relacionados con el manejo. Lamentablemente, en los casos más avanzados la eliminación de los animales reactores puede no ser compatible con la sostenibilidad económica del rebaño, debido, por ejemplo, a la reducción en la producción lechera por la mortalidad asociada y por la eliminación de un alto número de reactores en un corto periodo de tiempo.

Una alternativa en los rebaños con una alta prevalencia es la separación de los cabritos de las madres inmediatamente tras el parto, y la crianza con calostro y leches artificiales (Liébana et al., 1998; Álvarez et al., 2005). El uso de calostro combinado (procedente de varias madres) solo debe utilizarse cuando se tiene certeza absoluta de su inocuidad. La separación de los animales libres y su ubicación en áreas separadas debe asegurar de que no exista ninguna fuente potencial

de contacto. Esta estrategia de segregación puede contribuir a la viabilidad del rebaño a medio-largo plazo, pero requiere un compromiso férreo y duradero por parte del ganadero.

Para minimizar el riesgo de entrada de la infección es necesario establecer una serie de medidas de manejo en las explotaciones. Además de las medidas básicas de control de acceso de personas y vehículos y del mantenimiento de una correcta higiene en las explotaciones, realizando desinfecciones periódicas, es necesario controlar estrictamente el movimiento de animales, así como la exposición directa o indirecta a fauna silvestre infectada (Daniel et al., 2009; Shanahan et al., 2011).

El movimiento de animales infectados entre explotaciones es una de las formas más importantes de diseminación de la infección, de ahí que los programas existentes hagan especial hincapié en los controles previos y en las restricciones al movimiento. Las explotaciones indemnes solo deben introducir animales de idéntica calificación y controlados para este propósito. Esto afecta a la compra-venta de animales, a la asistencia a ferias, o al intercambio de machos para cubriciones (Daniel et al., 2009).

Vacunación

La vacunación puede ser una herramienta para reducir la prevalencia de la TB a medio-largo plazo en los rebaños caprinos afectados y, por su importancia, ha sido objeto de varios estudios experimentales en nuestro país. Los primeros ensayos experimentales en ganado caprino utilizaron BCG (Pérez de Val et al., 2012b, 2013). Otra opción evaluada ha sido una preparación de *M. bovis* inactivada por calor, con un adyuvante oleoso (Arrieta-Villegas et al., 2018; Roy et al., 2018b). Recientemente se han evaluado las vacunas vivas SO2 y MTBVAC, desarrolladas por mutación genética a partir de *M. tuberculosis* (Bezós et al., 2017; Roy et al., 2019b).

La eficacia de estas vacunas se ha estudiado con animales en condiciones experimentales y algunas también en ensayos de campo (exposición natural) en rebaños con alta prevalencia. En términos generales, los resultados obtenidos con estas vacunas son similares: la vacunación ofrece una protección parcial, es decir, no evita la infección, pero si reduce el número de animales con lesiones. Así mismo los animales vacunados muestran una menor patología y una menor diseminación extrapulmonar. También se reduce la carga bacteriana en pulmón y nódulos linfáticos pulmonares (Pérez de Val et al., 2012b, 2013; Bezós et al., 2017; Vidal et al., 2017; Arrieta-Villegas et al., 2018; Roy et al., 2018b, 2019b).

La aplicación de estas vacunas compromete la Sp de las pruebas de diagnóstico, afectando a los resultados de la IDTB, la prueba del IFN- γ , y en algunos casos, también del ELISA. Estas interferencias ocurren en una alta proporción de los

animales y pueden extenderse durante meses (Pérez de Val et al., 2012b, 2016; Bezos et al., 2015b, 2017; Vidal et al., 2017; Arrieta-Villegas et al., 2018; Roy et al., 2018b, 2019b). Los antígenos ESAT-6 y CFP-10 permiten un diagnóstico específico (*differentiate between infected and vaccinated animals*, DIVA) en animales vacunados con BCG o con SO₂; sin embargo, presentan la contrapartida de ser menos sensibles que la PPD bovina, por lo que pueden producir falsos negativos.

4.3.3. El ovino

Marta Muñoz, Olga Mínguez, Ana Balseiro

Antecedentes de la investigación de la infección causada por el MTBC en la especie ovina

Como ya se comentó en capítulos anteriores, las especies bacterianas incluidas en el MTBC tienen un amplio rango de hospedadores, incluyendo a animales domésticos y silvestres, lo que implica un sistema multi-hospedador donde las relaciones y contactos entre especies podrían generar un importante riesgo de transmisión y dificultar el control de la enfermedad (Gortázar et al., 2015).

Respecto a la especie ovina, en el pasado, ya existían referencias sobre casos puntuales de infección detectados en rebaños de todos los continentes. En Europa, en Reino Unido, en 1902, se describió el primer caso conocido de TB en una oveja de ese país (Foulerton, 1902). En 1928, en Edimburgo, se citaron también dos casos de TB generalizada en ovejas (Jowett, 1928). En la última década, se han sucedido las publicaciones que hacen referencia a infecciones de TB en rebaños ovinos europeos. En Irlanda del Norte y en Gales, se publicaron estudios que evidenciaban la existencia de rebaños de ovino infectados que convivían con bovinos también infectados, atribuyendo a estos últimos el origen de la infección, tras la realización de técnicas de biología molecular (Malone et al., 2003; van der Burgt et al., 2013).

En España, existían algunas citas relativas a casos clínicos puntuales de TB o a rebaños ovinos concretos (García Marín et al., 1989; Aranaz et al., 1996; Gutiérrez et al., 1997; Muñoz-Mendoza et al., 2012) pero, tradicionalmente, el ganado ovino siempre se había considerado menos susceptible a la TB que otros rumiantes domésticos como el bovino y el caprino.

En consecuencia, hasta hace unos años, la información que existía sobre la epidemiología, patogenia, patología y respuesta de los ovinos a las diferentes pruebas diagnósticas de TB era prácticamente inexistente. Por ello, en la última década, se inició un estudio en dicha temática por parte de los servicios

veterinarios oficiales de la Xunta de Galicia y del SERIDA (Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario del Principado de Asturias).

Entre 2009 y 2013 diferentes especies de MTBC (*M. bovis* y *M. caprae*) fueron aisladas e identificadas a partir de 215 rebaños bovinos infectados de Galicia (Comunidad Autónoma de baja prevalencia), 33 de los cuales convivían con ganado ovino (33/215). Un total de 897 ovinos de 23 rebaños (de los 33 anteriormente citados) fueron analizados utilizando diferentes técnicas diagnósticas (IDTBs, ELISA, IFN- γ , cultivo microbiológico e histopatología, Muñoz-Mendoza et al., 2016), con el fin de detectar una posible infección de TB causada por las cepas aisladas en los bovinos o caprinos con los que cohabitaban.

Como resultados destacables, se observó que de los 159 ovinos analizados tras su sacrificio, 50,44% fueron positivos por cultivo microbiológico, 83,23% por histopatología y 24,92%, 4,86% y 59,42% por IDTB, IFN- γ y ELISA, respectivamente. Se comprobó en todos los casos que las mismas cepas de *M. bovis* y *M. caprae* eran compartidas entre los ovinos y los bovinos y/o caprinos con los que convivían, demostrando un vínculo o nexo epidemiológico (Figura 37). Tras el sacrificio de los ovinos implicados se detectaron lesiones macroscópicas compatibles con TB en 16 de los 23 rebaños (69,56%) y en 97 de los 159 de los ovinos examinados (61%). El examen *post mortem* reveló diferentes grados de extensión de las lesiones, que fueron clasificadas como de “pequeños nódulos” cuando su extensión era menor de 5 cm de diámetro y que estaban presentes en la mayoría de los animales (94/97, 96,91%), y como de “grandes nódulos” cuando consistían en lesiones difusas con contenido purulento o caseoso, por lo general parcialmente calcificado, y que ocupaban una porción o todo el tejido (3/97; 3,09%, Figura 38).



Figura 37. Ejemplo de rebaño mixto, en este caso, bovino y ovino.

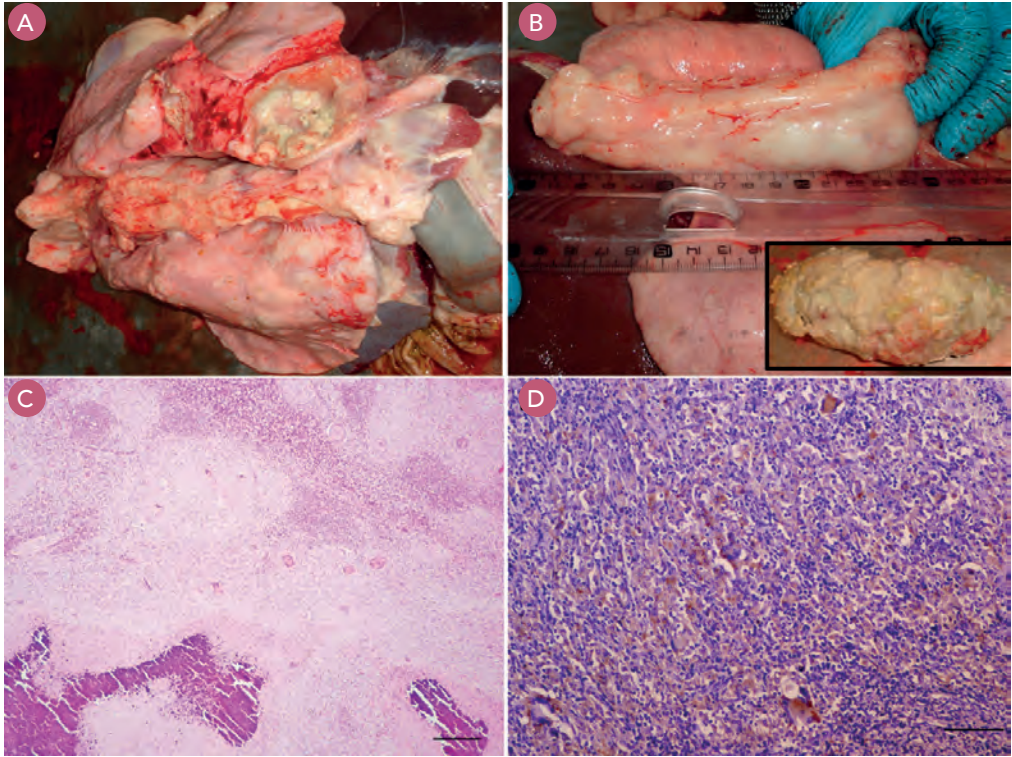


Figura 38. Lesiones tuberculosas en ovino.

- A) Lesiones de tuberculosis de grandes nódulos y difusas en pulmón.
B) Lesiones difusas en nódulos linfáticos, con presencia de necrosis caseosa.
C) Imagen histológica donde es frecuente encontrar calcificación y mineralización central.
Tinción hematoxilina-eosina, barra=200 micras.
D) Mediante tinción inmunohistoquímica en estas lesiones predominan los macrófagos.
Tinción ABC complejo, barra=100 micras.

Todas las técnicas inmunológicas utilizadas en el estudio (IDTB, IFN- γ y ELISA) demostraron ser útiles para la detección de la infección de TB en el ganado ovino aunque con limitaciones. Mientras que el ELISA presentó una Se moderada o buena, la IDTB y el IFN- γ proporcionaron baja Se *a priori*.

Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que los ovinos, cuando comparten instalaciones o cohabitan estrechamente con ganado bovino o caprino infectado de TB, deberían tenerse en cuenta como fuentes potenciales de TB residual para esos rebaños y deberían analizarse para comprobar su estado, ya que podrían participar en la epidemiología de la enfermedad en estos rebaños multi-especie en los sistemas de explotación descritos (Figura 37). Las mismas técnicas de diagnóstico que ya están en uso para el ganado bovino y caprino (IDTB/IFN- γ) podrían ser utilizadas para estos fines, ya que ambas detectaron los

casos más avanzados. Sin embargo, la IDTBs y el ELISA podrían ser los planteamientos iniciales futuros más sencillos y rentables para el diagnóstico de la TB en rebaños de ovinos en condiciones de campo. Cuando esté estratégicamente indicado, el IFN- γ se debería aplicar con el fin de aumentar la Se de las pruebas.

Situación actual de la investigación de la infección causada por MTBC en la especie ovina

Hoy por hoy, a raíz de la información anteriormente descrita, podemos afirmar que el ganado ovino es susceptible a la infección y comparte las mismas cepas que otras especies domésticas con las que comparte hábitat.

En España, según los datos del MAPA, el número de hembras ovinas mayores de 12 meses en explotaciones de reproducción es de 12.066.127 animales y el de hembras caprinas de esa misma edad es de 2.147.186 reses. Una proporción importante de estas reses ovinas, en ocasiones, conviven o tienen relaciones epidemiológicas con rebaños bovinos y/o caprinos.

En los últimos años, en distintas Comunidades Autónomas del país se han aislado diferentes perfiles de *M. bovis* y *M. caprae* en ovinos. De hecho, en la base de datos MycoDB.es están ya identificados, desde 1996, 210 aislados de MTBC en ovejas y muflón (*Ovis aries*), de los cuales 132 fueron identificados como *M. bovis* pertenecientes a 9 perfiles de espoligotipos diferentes, y 78 fueron descritos como *M. caprae* pertenecientes a 3 espoligotipos distintos (MycoDB.es, consulta realizada el 12.09.2019). Los diferentes aislamientos han tenido lugar en Andalucía, Cantabria, Castilla-La Mancha, Castilla y León, Cataluña, Galicia, Madrid, Navarra y La Rioja.

En Cataluña, en 2017, también fue detectado un brote de TB en un rebaño mixto de ovejas y cabras de aptitud lechera. Los hallazgos manifestaron una transmisión directa de la infección (*M. caprae* espoligotipo perfil SB0157) entre ambas especies, evidenciando que cabras y ovejas pueden actuar como reservorios domésticos de TB (Vidal et al., 2018).

Sin embargo, desde el punto de vista diagnóstico en esta especie, recientemente se realizó una caracterización inmunohistoquímica de las lesiones tuberculosas en ovejas naturalmente infectadas con *M. bovis* (Vallejo et al., 2018). Este estudio caracterizó los estadios de los granulomas tuberculosos causados por MTBC en ovino, comparándolos con los de otras especies e identificando las posibles diferencias en la respuesta inmune de los ovinos (a través de cuatro protocolos inmunohistoquímicos para la detección específica de linfocitos T, linfocitos B, células plasmáticas y macrófagos). Los resultados mostraron que el estudio de los granulomas del tejido linfático refuerza la idea de que existen tres diferentes tipos de granulomas representativos de la progresión de las lesiones

(inicial, desarrollado y terminal) y sugieren una explicación a la alta resistencia de las ovejas a la TB basada en una efectiva respuesta inmune innata para el control de la infección. Esta conclusión enlaza con lo citado en el estudio de Balseiro et al. (2017).

Diagnóstico y control

En los últimos años, también se han puesto en marcha algunos test diagnósticos que en la especie ovina han obtenido resultados alentadores. La detección de anticuerpos en suero es una técnica de diagnóstico complementaria en el caso de la TB, particularmente en sistemas multi-hospedador. El uso del nuevo complejo multiproteína P22 para la detección de anticuerpos específicos (ELISA) frente a MTBC fue testado en diferentes especies (Infantes-Lorenzo et al., 2019b), entre ellas la ovina, utilizando sueros con origen en España y sueros procedentes de animales de Noruega, un país oficialmente indemne de TB (OTF). La Sp obtenida en el test se estimó entre un 94,4 (CI95% 91,7–96,3) y un 100% (CI95% 96,3–100) dependiendo del punto de corte y del país. Además no se detectaron interferencias en un rebaño infectado por *C. pseudotuberculosis*.

Es importante también citar otro estudio serológico más específico, orientado a la detección de la prevalencia de TB en ovejas en la España Atlántica (Infantes-Lorenzo et al., 2020). Se evaluó el uso del nuevo complejo multiproteína P22 para la detección de anticuerpos específicos frente a MTBC. Los resultados basados en sueros de 80 ovejas infectadas de TB sugirieron una excelente Se y Sp (100% y 98%, respectivamente), incluso en un rebaño infectado por MAP. El análisis de 3.998 sueros de ovinos de la España Atlántica norte en áreas de alta prevalencia en ganado bovino, determinó una prevalencia del 17,96% (698/3.998; CI95% 16,31-18,67) mediante el uso de dicha técnica. Esta prevalencia teórica en el noroeste de España merece un estudio más preciso en profundidad.

Un reciente estudio de investigación valoró el efecto de la vacuna BCG y de una vacuna elaborada a partir de una cepa de *M. bovis* inactivada por calor, en un modelo de infección experimental en ovinos (Balseiro et al., 2017). El objetivo de este estudio fue conocer la patología y patogenia de la enfermedad, así como la respuesta de los corderos a la vacunación frente a la TB para poder establecer, en su caso, pautas de actuación ante un rebaño ovino que conviva con un rebaño bovino y/o caprino infectado. En dicho estudio se demostró que los corderos son susceptibles a la infección experimental por *M. caprae*, con un patrón patológico e inmunológico similar al de la infección en caprino. Además, la vacunación subcutánea con la vacuna BCG confirió protección frente a la TB por lo que, llegado el momento, ofrecería una posibilidad efectiva de control de la enfermedad. Por otra parte, el estudio exhaustivo de las lesiones en esta

especie reveló que las ovejas pueden ser consideradas huéspedes con un desarrollo particular e inusual de lesiones, con baja presencia de micobacterias en las mismas. Este hallazgo indicaría la presencia de un ambiente negativo para el crecimiento bacteriano y una menor capacidad de excreción de micobacterias y, en consecuencia, de propagación y transmisión de la enfermedad.

Cuestiones al respecto que plantea el sector ovino a los servicios veterinarios oficiales e investigadores

Ante la situación descrita, son numerosas las cuestiones que se plantea el sector respecto a la vigilancia y al control de la enfermedad en esta especie. A continuación se citan algunas de las más frecuentes:

¿Qué factores predisponen a la presencia de la tuberculosis en un rebaño de ovejas?

El principal reservorio doméstico de la TB animal son los bovinos infectados y, paralelamente, también los caprinos que puedan convivir con ellos. Por tanto, la posibilidad de contacto directo y/o indirecto de los ovinos con rebaños bovinos y/o caprinos infectados sería el principal riesgo. Por supuesto, incrementar las medidas de bioseguridad de la granja, evitar la entrada de animales externos al rebaño (fomentando la cría en la explotación), realizar los tratamientos preventivos precisos, evitar el estrés continuado mediante un manejo adecuado y mantener el rebaño bien alimentado, son medidas básicas para minimizar las posibilidades de presencia de TB en un rebaño de ovejas.

¿Cómo se produce la infección en las ovejas? Por su parte, ¿el ganado ovino puede transmitir la infección a otras especies?

La TB animal es una enfermedad compartida que se desarrolla en una interfaz entre el ganado doméstico, fauna silvestre y medio ambiente (Bengis et al., 2002), siendo el ganado bovino el principal reservorio doméstico habitual. Los estudios en Galicia y Cataluña demostraron que los ovinos son susceptibles a la infección causada por *M. bovis* y *M. caprae*. En estas áreas geográficas, también se observó que dicha infección, lejos de ser un episodio aislado que afecte a rebaños puntuales, como había sido descrito previamente en otros trabajos, es frecuente entre los rebaños de ovino que conviven con bovinos y/o caprinos infectados en pequeños rebaños multi-especie. En estas condiciones, y en función de la extensión de las lesiones, algunos de los ovinos infectados también podrían ser excretores y participar de la contaminación ambiental existente. No obstante, solo un 3,09% de los animales con lesiones sometidos a estudio histopatológico

presentaron lesiones más extensas y susceptibles de excretar un número elevado de micobacterias.

¿Cómo evoluciona normalmente una oveja afectada por tuberculosis?

Los estudios del modelo de infección, basados en infecciones experimentales, son los que pueden ayudar a definir mejor la evolución detallada de la infección. En infecciones de campo se observó que, en ovinos, se genera aparentemente una progresión más lenta de la infección, en comparación con otras especies domésticas. El estudio antes citado, sobre la caracterización inmunohistoquímica de las lesiones tuberculosas en infecciones de campo, señaló tres tipos diferentes de granulomas que representan diferentes estadios de progresión de la enfermedad y sugieren una mayor resistencia de las ovejas basada en una mayor respuesta inmune innata al control de la infección por TB (Vallejo et al., 2018). Es decir, aparentemente, en ovejas la infección parece progresar más lentamente que en otras especies domésticas susceptibles.

¿Cuáles son las lesiones más habituales en las ovejas afectadas por tuberculosis? ¿Qué síntomas se presentan en la especie ovina?

Se observó que las lesiones más habituales en las ovejas infectadas por MTBC aparecían en el aparato respiratorio, concretamente en los pulmones y nódulos linfáticos bronquiales y mediastínicos, en una distribución lesional similar a la propuesta inicialmente para los bovinos (Corner, 1994; García Castro, 2007). En casos puntuales, en animales que presentaban lesiones extensas en pulmón, se observó sintomatología respiratoria asociada (tos, disnea y descarga nasal, principalmente), pero evidentemente esos síntomas son inespecíficos y compatibles con otras múltiples patologías parasitarias, víricas y bacterianas.

¿Cómo puede realizarse el diagnóstico de la enfermedad? ¿Son necesarias pruebas de laboratorio?

Por parte del personal titular de la granja y del personal veterinario clínico, ante la sospecha de TB en un rebaño ovino es obligatoria la comunicación de esta circunstancia a los servicios veterinarios oficiales, según lo recogido en el artículo 5 de la Ley 8/2003, de 24 de abril, de sanidad animal. La autoridad sanitaria está especializada en el diagnóstico de la enfermedad y tiene diferentes técnicas diagnósticas *in vivo* y *post mortem* a su disposición (IDTB, IFN- γ , inmunohistoquímica, histopatología, bacteriología y biología molecular, según el caso a tratar). En los rebaños sospechosos es también importante realizar vigilancia pasiva de los animales sacrificados en matadero o muertos en la explotación, con investigación microbiológica, histopatológica e inmunohistoquímica, si el caso lo precisase (MAPA, 2019c).

¿Existen problemas de diagnóstico en las explotaciones que vacunen de paratuberculosis?

La vacunación, en determinados momentos y circunstancias, puede llegar a interferir en el diagnóstico de la TB. No obstante, si se está trabajando con un rebaño sospechoso, los servicios veterinarios oficiales tienen herramientas diagnósticas discriminatorias que, unidas al estudio epidemiológico individualizado de la explotación y a la vigilancia pasiva permitirían llegar a conclusiones diagnósticas fiables.

¿Sería aconsejable que los ovinos fuesen sometidos a saneamiento ganadero o que fuesen objeto de vigilancia en determinadas zonas y sistemas de producción?

Los programas nacionales de erradicación se basan en criterios técnicos y legales, y se centran en las especies reservorio evidenciadas científicamente como claves para el control de la infección, donde las medidas aplicadas serán más efectivas en función del riesgo existente. En los estudios científicos anteriormente descritos se citaron condiciones epidemiológicas concretas y sistemas de producción y manejo en los que la especie ovina debería tenerse en cuenta para el control de la infección (pequeños rebaños multi-especie que forman parte de una unidad epidemiológica en la que existen bovinos y/o caprinos infectados).

¿Los ganaderos y/o personal veterinario están en general concienciados de la importancia de esta enfermedad en los ovinos?

Los estudios científicos anteriormente descritos son novedosos y rompen con la idea arraigada del ovino como especie absolutamente resistente a la TB, por lo que es complicado que se produzca una concienciación rápida y a corto plazo entre las personas que trabajan en el sector. No obstante, la autoridad sanitaria es consciente del riesgo puntual de los rebaños ovinos de una unidad epidemiológica infectada.

¿Qué aspectos quedan por estudiar de esta enfermedad para mejorar su conocimiento y su control en el ovino?

Como ya se comentó, se han realizado estudios experimentales del modelo de infección y de la seguridad y eficacia de las vacunas (Balseiro et al., 2017), así como de la caracterización inmunohistoquímica de las lesiones tuberculosas (Vallejo et al., 2018). En diferentes áreas geográficas, se están llevando a cabo estudios de supervivencia y persistencia de MTBC en el medio (barro, agua, etc.) y de identificación de factores epidemiológicos y de manejo que puedan influir en la persistencia de MTBC, entre otros. Otras líneas de investigación actual trabajan con herramientas diagnósticas (como es el caso de la multiproteína P22) que pueden ser utilizadas en un acercamiento a la prevalencia de la TB en la especie en áreas geográficas extensas. Esta información sería de gran importancia para poder diseñar actuaciones puntuales dirigidas, si fuese el caso.

En este contexto, ¿puede suponer el ovino un obstáculo para el control de la tuberculosis en otras especies como el bovino o el caprino?

En el contexto estudiado en Galicia, ante la existencia de un foco de TB en bovinos y/o caprinos de una unidad epidemiológica multi-especie, siempre consideramos que está indicado tomar medidas sobre la unidad epidemiológica afectada, incluyendo a los ovinos en todas las medidas de control obligatorias prescritas.

4.3.4. El porcino

Ignacio García Bocanegra, Javier Hermoso de Mendoza, David Cano

Importancia del sector porcino en España

España presenta el mayor censo de porcino en Europa y ocupa el cuarto lugar en cuanto a producción de ganadería porcina a nivel mundial, detrás de China, Estados Unidos y Alemania. El sector porcino en España representa alrededor del 39% de la producción final ganadera, desempeñando un importante papel en la economía de nuestro país. Dentro de este sector, la producción derivada del ganado porcino criado en sistemas de producción extensivos supone alrededor del 10% de la producción porcina nacional, estando concentradas en torno al 80% de las explotaciones de cerdo en extensivo en las regiones del suroeste (Andalucía y Extremadura) del país (Figura 39).

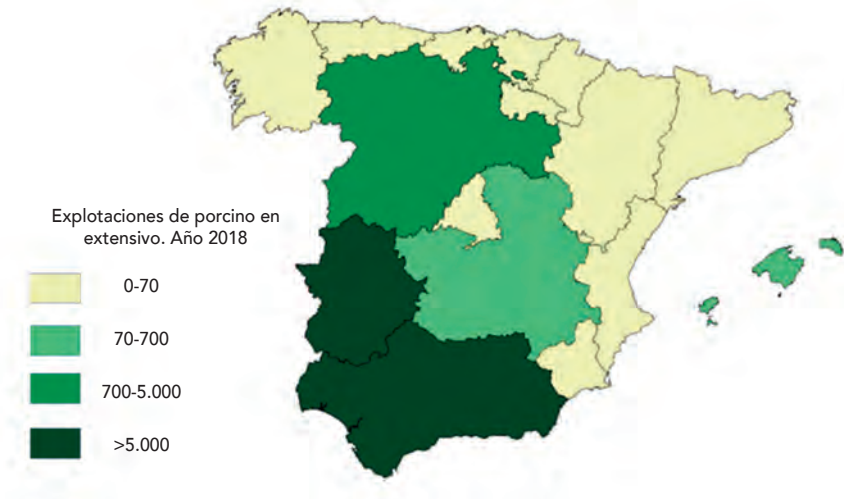


Figura 39. Distribución de las explotaciones de porcino en extensivo por Comunidades Autónomas en España. Adaptado de MAPA (2018).

Importancia del porcino como hospedador de la tuberculosis animal

En la última década, se han confirmado casos de TB en el cerdo doméstico en diversos países, incluidos Italia (Di-Marco et al., 2012), Uganda (Muwonge et al., 2012), Reino Unido (Bailey et al., 2013), Polonia (Lipiec et al., 2019), Argentina (Barandiaran et al., 2019) y España (Cardoso-Toset et al., 2015; Cano-Terriza et al., 2018a). Aunque se ha demostrado que esta especie es sensible a la infección por MTBC, la TB no es una enfermedad altamente contagiosa en el cerdo, estando asociada en la mayoría de los casos a infecciones autolimitantes. Por ello, el porcino se considera, en general, un hospedador accidental (*spillover*) más que un verdadero reservorio de MTBC. Sin embargo, el papel epidemiológico de esta especie en el mantenimiento de MTBC, no está claramente definido, siendo variable en función del sistema productivo y del ecosistema en el que se cría. Así, el cerdo doméstico se considera una especie de poca relevancia en la epidemiología de la TB en sistemas de producción intensiva, dado que los animales se mantienen confinados y son sacrificados a una edad temprana (Guta et al., 2014a). No obstante, la situación epidemiológica y, por ende, el potencial papel de esta especie en la epidemiología de la TB, es completamente diferente en ecosistemas mediterráneos del sur de Europa, donde el porcino se mantiene, con frecuencia, en condiciones de manejo extensivo. En España, el cerdo ibérico y sus cruces se cría, generalmente, entre los 3 y los 18 meses de edad en la dehesa, comparten los recursos naturales disponibles con otras especies domésticas y silvestres (Parra et al., 2003). Este sistema productivo puede favorecer la transmisión inter-especie multidireccional de MTBC del porcino con otras especies consideradas reservorios de la TB como el bovino, jabalí o caprino (Naranjo et al., 2008; Gortázar et al., 2012; Napp et al., 2013). Además, el periodo de montanera se considera de especial riesgo sanitario debido a la difícil aplicación de las medidas de bioseguridad dirigidas a evitar el contacto directo e indirecto con estas especies simpátricas (Carrasco-García et al., 2016) (Figura 40).

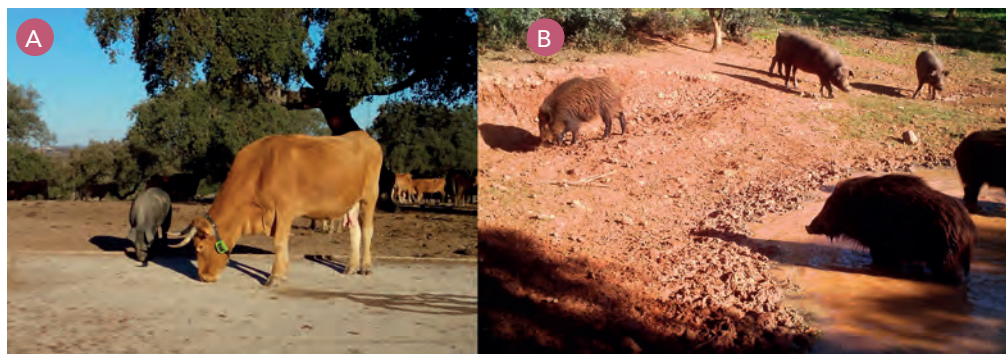


Figura 40. Interacción espaciotemporal del porcino en extensivo con el ganado bovino (A) y el jabalí (B).

Por lo tanto, teniendo en cuenta el carácter multi-hospedador de MTBC, un aspecto fundamental para el control de la TB animal es evaluar el papel del porcino en cada contexto epidemiológico. Estudios previos realizados en ecosistemas mediterráneos en Italia indicaron que el cerdo negro siciliano, criado en sistemas de producción extensivos, podría actuar como un verdadero reservorio de MTBC (Di-Marco et al., 2012). Este hecho cobra especial relevancia en países con TB endémica, como Gran Bretaña, donde Bailey et al. (2013) evidenciaron que el contacto entre diferentes especies animales, incluido el porcino, en sistemas extensivos, favorece la circulación de los miembros del MTBC. Entre sus conclusiones, Bailey et al. (2013) indicaron que el cerdo doméstico no parece jugar un papel relevante como reservorio en Gran Bretaña; no obstante, señalaron que podría ser una especie centinela útil para monitorizar infecciones por MTBC (Bailey et al., 2013; Nugent et al., 2015).

En España, a pesar del potencial papel del cerdo en la epidemiología del MTBC (Parra et al., 2003), esta especie no se encuentra sometida a programas de vigilancia de TB y la información científica disponible sigue siendo limitada en la actualidad. Por ello, en los últimos años se han llevado a cabo diversos estudios epidemiológicos sobre la TB en cerdos criados en extensivo, particularmente en regiones del sur y suroeste de España, donde el ganado bovino se mantiene, con frecuencia, en sistemas extensivos, compartiendo hábitat con el porcino extensivo (Figura 40). Además, tanto el bovino como el jabalí presentan elevadas prevalencias de TB en estas regiones (ver capítulos 4.3.1. y 4.3.6.).

Los primeros estudios epidemiológicos relacionados con la TB en el porcino se llevaron a cabo por Tato (1999) que aisló, identificó y tipó siete aislados de *M. bovis*, con predominio, ya entonces, de los espoligotipos SB0121 y SB0134, identificados también en otras especies. Parra et al. (2003, 2005) continuaron y ampliaron estos hallazgos a principios de los años 2000. Estos trabajos confirmaron la infección por MTBC en el cerdo ibérico en regiones del suroeste de España. Posteriormente, Gómez-Laguna et al. (2010) pusieron de manifiesto que las lesiones compatibles con TB eran un hallazgo habitual durante la vigilancia pasiva en mataderos. De igual modo, Cardoso-Toset et al. (2015), pusieron de manifiesto que las lesiones compatibles con TB siguen siendo habituales durante la vigilancia pasiva en mataderos, siendo frecuentes los decomisos de canales de cerdos manejados en sistemas extensivos por la presencia de dichas lesiones. Estos decomisos suponen pérdidas económicas importantes para el sector (García-Jiménez y Salguero, 2016). Así mismo, estudios moleculares realizados a partir de aislados de MTBC en el cerdo criado en extensivo en el centro y sur de España, confirmaron que esta especie comparte espoligotipos con el ganado bovino, caprino y con diferentes especies de ungulados silvestres (Parra et al., 2003; Rodríguez et al., 2010; García-Bocanegra et al., 2012; García-Jiménez et al., 2016), lo que soporta la hipótesis de una transmisión inter-especie multidireccional de MTBC.

En los últimos años, se han realizado estudios epidemiológicos para conocer la seroprevalencia, distribución y factores de riesgo asociados a la TB en las explotaciones de porcino criado en sistemas de producción extensivos en España. En un estudio realizado por Cano-Terriza et al. (2018a) en Andalucía entre los años 2015 y 2017, se analizaron 3.622 muestras de suero de cerdos procedentes de 129 explotaciones. Las muestras se analizaron empleando un ELISA indirecto no comercial basado en el combinado proteico P22 como antígeno con una Se del 84,1% y una Sp del 98,4% (Thomas et al., 2019a). Así mismo, se realizó cultivo y espigotipado de las lesiones compatibles con TB obtenidas durante la inspección *post mortem* en matadero. Los resultados obtenidos determinaron una seroprevalencia individual de TB en porcino extensivo en Andalucía del 2,3% (82/3.622; IC95%: 1,8%-2,8%). A nivel de explotación se alcanzó una prevalencia del 24,8% (32/129; IC95%: 17,4%-32,3%), variando las prevalencias dentro de granjas entre el 2,8% y el 33,3% (mediana: 6,7%; media: 8,9%). Además, en el 41,0% (25/61) de los municipios analizados se detectó al menos una granja positiva a micobacterias del MTBC. La seropositividad fue significativamente mayor en reproductores (3,7% de 1.044) que en cerdos de cebo (1,7% de 2.329), lo que coincide con lo previamente observado en el cerdo negro siciliano (Di-Marco et al., 2012) y en el jabalí (García-Bocanegra et al., 2012). Este resultado podría ser explicado por el hecho de que, debido a una vida productiva más larga, los reproductores tienen más probabilidad de exposición a MTBC, y también por la persistencia de anticuerpos a lo largo del tiempo. Además, la seroprevalencia fue significativamente mayor en los cerdos de cebo procedentes de granjas con presencia de animales reproductores, lo que sugiere una posible transmisión dentro de la granja a una edad temprana, ya sea a través de las madres o por contacto entre lechones infectados. Del mismo modo, la seropositividad detectada en cerdos de cebo en explotaciones en las que no hubo infección por MTBC en reproductores, puede indicar que estos animales se infectaron durante el periodo de aprimalamiento o montanera, etapas en las que aumenta el riesgo de infección por contacto directo o indirecto con otros reservorios simpátricos de MTBC.

En este estudio, también se llevó a cabo un análisis de factores de riesgo de infección por MTBC en esta especie, identificándose el censo porcino (a mayor censo, mayor seroprevalencia) y la presencia de explotaciones caprinas colindantes como los principales factores de riesgo asociados a la seropositividad frente a micobacterias del MTBC en las explotaciones porcinas analizadas. La mayor seroprevalencia encontrada en explotaciones con censo más elevado podría ser explicada por la dinámica de transmisión de la TB, que depende de varios factores, entre los que se encuentran la densidad de animales y el tamaño del rebaño (Ramírez-Villaescusa et al., 2010; Álvarez et al., 2012a; Vicente et al., 2013). Por otro lado, la presencia de rebaños de cabras en explotaciones colindantes como

un factor de riesgo de TB en las explotaciones de porcino extensivo, fue consistente con el papel de las cabras como reservorio de MTBC (Napp et al., 2013, ver capítulo 4.3.2.).

Además, durante el periodo de estudio, se identificaron 189 lesiones compatibles con TB, confirmadas mediante cultivo bacteriológico. De éstas, 175 (92,6%) fueron producidas por *M. bovis*, y las 14 restantes por *M. caprae*. Se detectaron 25 espoligotipos diferentes, siendo el más frecuentemente aislado el SB0121 (26,6%), seguido del SB0134 (20,7%), SB0295/SB1190 (10,1%), SB0157 (5,3%) y SB0265/SB1174 (4,1%). Todos estos espoligotipos se habían detectado previamente en otras especies domésticas y silvestres en España (Parra et al., 2005; Rodríguez et al., 2010; García-Jiménez et al., 2016). Cabe señalar que el espoligotipo de *M. bovis* SB0121, el más frecuentemente aislado, es también el más prevalente en el ganado bovino y en jabalíes en España (Rodríguez et al., 2010; García-Jiménez et al., 2016). Así mismo, 14 de los 189 aislados identificados correspondieron al SB0157, el espoligotipo de *M. caprae* más frecuente en bovino y en especies silvestres en nuestro país (Rodríguez et al., 2011).

Otro estudio similar ha sido realizado por el MAPA, en colaboración con el grupo de investigación AGR-149 "Enfermedades Infecciosas" del Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de Córdoba. En este trabajo se evaluó la seroprevalencia de MTBC a nivel individual y de explotación en el ganado porcino extensivo en España durante el periodo 2016-2017. Para ello, se realizó un muestreo estratificado en base al censo de las explotaciones presentes en cada una de las principales comarcas ganaderas con presencia de porcino extensivo en España.

A lo largo del periodo de estudio se analizaron, empleando un ELISA indirecto comercial (TB ELISA-VK, Vacunek®, Derio, España), un total de 11.546 cerdos criados en sistemas de producción extensiva procedentes de 391 explotaciones distribuidas en 10 provincias (6 en Andalucía, 2 en Extremadura, 1 en Castilla y León y 1 en Castilla-La Mancha). En total, se tomaron muestras procedentes de 168 términos municipales incluidos en 44 comarcas ganaderas. Se detectaron anticuerpos frente a MTBC en 473 de los cerdos analizados, lo que supuso una seropositividad individual del 4,1% (IC_{95%}: 3,7-4,5). Por otra parte, en 109 de las 391 (27,9%; IC_{95%}: 23,4-32,3) explotaciones se detectó al menos un animal seropositivo. En las explotaciones positivas, las prevalencias dentro de granjas variaron entre el 2,7% y el 73,3% (mediana = 16%; media = 16,6%). Por Comunidades Autónomas, Castilla y León presentó la mayor seroprevalencia a nivel de explotación con un 32,4%, seguida de Extremadura con un 29,6%, Andalucía con un 25,7% y Castilla-La Mancha con un 25% (Tabla 10, Figura 41).

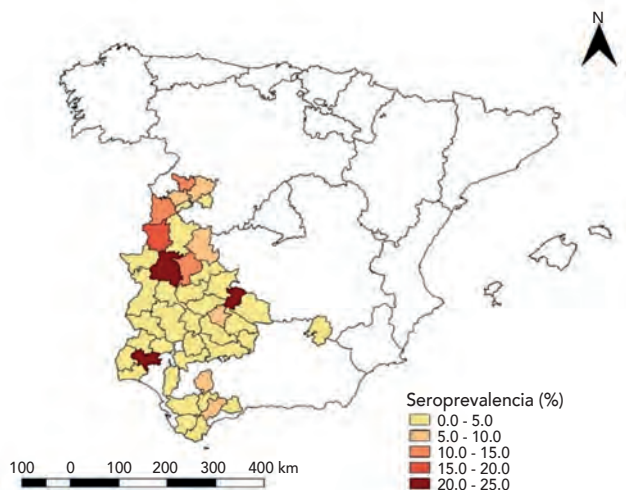


Figura 41. Resultados de seroprevalencia obtenidos por comarca ganadera analizada.

En 8 de las 10 (80,0%) provincias analizadas, así como en 73 de los 168 (43,5%) municipios analizados se detectaron explotaciones positivas. Con respecto a las provincias, Cáceres presentó la seropositividad por explotación más elevada (41,4%), seguida de Salamanca (32,4%), Huelva (30,9%), Sevilla (30,4%), Badajoz (26,9%), Ciudad Real (25%), Córdoba (22,5%) y Málaga (20%). En Cádiz y Jaén, no se detectaron explotaciones con animales seropositivos frente a MTBC.

Tabla 10. Prevalencias de anticuerpos frente al complejo *Mycobacterium tuberculosis* a nivel individual y de explotación en cerdo extensivo en España (2016-2017).

Comunidad Autónoma/ Provincia y comarca ganadera	Explotaciones			Individuos		
	Nº analizadas	Nº positivas	%	Nº analizados	Nº positivos	%
ANDALUCÍA	194	50	25,8	5655	150	2,7
Cádiz	5	0	0,0	151	0	0,0
Campaña de Jerez	1	0	0,0	30	0	0,0
Campo de Gibraltar	1	0	0,0	31	0	0,0
La Janda	1	0	0,0	30	0	0,0
Sierra de Cádiz	2	0	0,0	60	0	0,0
Córdoba	89	20	22,5	2601	51	2,0
Alto Guadalquivir	2	1	50,0	60	1	1,7

Comunidad Autónoma/ Provincia y comarca ganadera	Explotaciones			Individuos		
	Nº analizadas	Nº positivas	%	Nº analizados	Nº positivos	%
Pedroches I	62	11	17,7	1789	21	1,2
Pedroches II	5	3	60,0	152	14	9,2
Valle del Guadiato	17	4	23,5	510	13	2,5
Vega del Guadalquivir	3	1	33,3	90	2	2,2
Huelva	71	22	31,0	2127	74	3,5
Andévalo Occidental	5	3	60,0	144	4	2,8
Andévalo Oriental	4	3	75,0	122	28	23,0
Costa Occidental	1	0	0,0	30	0	0,0
Sierra Occidental	20	6	30,0	602	11	1,8
Sierra Oriental	41	10	24,4	1259	31	2,5
Jaén	1	0	0,0	30	0	0,0
Sierra de Segura	1	0	0,0	30	0	0,0
Málaga	5	1	20,0	143	8	5,6
Guadalhorce Occidental	1	0	0,0	30	0	0,0
Ronda	4	1	25,0	113	8	7,1
Sevilla	23	7	30,4	603	17	2,8
Poniente de Sevilla	6	1	16,7	176	4	2,3
Serranía del Suroeste	3	2	66,7	90	5	5,6
Sierra Norte	12	3	25,0	271	7	2,6
Vega de Sevilla	2	1	50,0	66	1	1,5
CASTILLA-LA MANCHA	4	1	25,0	71	3	4,2
Ciudad Real	4	1	25,0	71	3	4,2
Almadén	1	1	100	12	3	25,0
Almodóvar del Campo	3	0	0,0	59	0	0,0
CASTILLA Y LEÓN	34	11	32,4	1020	97	9,5
Salamanca	34	11	32,4	1020	97	9,5
Alba de Tormes	2	2	100,0	60	2	3,3
Ciudad Rodrigo	14	5	35,7	420	53	12,6
Fuente San Esteban	9	2	22,2	270	25	9,3

Comunidad Autónoma/ Provincia y comarca ganadera	Explotaciones			Individuos		
	Nº analizadas	Nº positivas	%	Nº analizados	Nº positivos	%
Ledesma	4	1	25,0	120	13	10,8
Salamanca	2	1	50,0	60	4	6,7
Tamames	3	0	0,0	90	0	0,0
EXTREMADURA	159	47	29,6	4800	223	4,6
Badajoz	130	35	26,9	3930	128	3,3
Azuaga	6	3	50,0	180	8	4,4
Badajoz	27	7	25,9	810	30	3,7
Castuera	3	0	0,0	90	0	0,0
Don Benito	1	0	0,0	30	0	0,0
Herrera Duque	3	2	66,7	90	3	3,3
Jerez Caballeros	56	15	26,8	1710	75	4,4
Mérida	5	1	20,0	150	1	0,7
Zafra	29	7	24,1	870	11	1,3
Cáceres	29	12	41,4	870	95	10,9
Cáceres	7	4	57,1	210	44	21,0
Coria	3	1	33,3	90	15	16,7
Navalmoral	4	2	50,0	120	12	10,0
Plasencia	3	1	33,3	90	3	3,3
Trujillo	4	3	75,0	120	17	14,2
Valencia Alcántara	6	1	16,7	180	4	2,2
Zorita	2	0	0,0	60	0	0,0
Total general	391	109	27,9	11546	473	4,1

Las seropositividades detectadas en estos dos estudios (2,3% y 4,1%) fueron consistentes con las obtenidas por Di-Marco et al. (2012) en cerdo negro siciliano en Italia (3,4% de 119 animales analizados empleando cultivo microbiológico) y sugieren que el porcino en extensivo desempeña un papel como hospedador accidental más que como un verdadero reservorio de MTBC en ecosistemas mediterráneos. Sin embargo, las elevadas prevalencias a nivel de explotación obtenidas en los estudios realizados en Andalucía y España (24,8% y 27,9%, respectivamente) indican una amplia dispersión del MTBC en explotaciones de cerdo criado en sistemas de manejo extensivo en España. Además, los resultados del

análisis espacial realizado por Cano-Terriza et al. (2018a) en Andalucía determinaron una positividad significativamente superior en la parte noroeste de la comunidad, con la presencia de dos clústeres espaciales estadísticamente significativos (Figura 42). Dichas áreas se ubicaron en zonas con una alta prevalencia de micobacterias del MTBC en ganado bovino y en fauna silvestre (García-Bocanegra et al., 2012; MAPA, 2019a). Por su parte, la seropositividad detectada en las diferentes Comunidades Autónomas fue homogénea, oscilando entre el 25% y el 33,4%. Sin embargo, las prevalencias de las distintas comarcas ganaderas fueron muy variables (0-100%), siendo las comarcas del centro y del oeste del país las que presentaron un mayor número de animales seropositivos (Tabla 10).

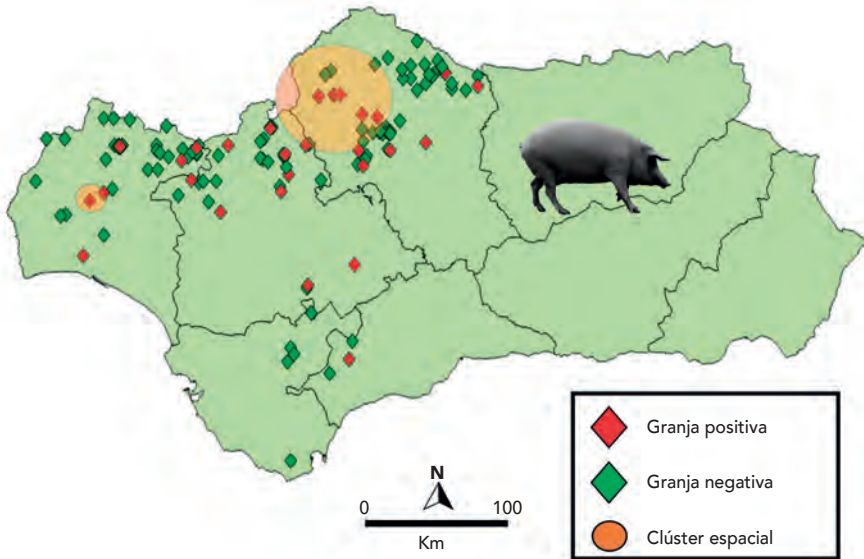


Figura 42. Distribución de las explotaciones porcinas muestreadas por Cano-Terriza et al. (2018a) en Andalucía. Los rombos rojos y verdes indican granjas positivas y negativas, respectivamente. Los círculos en naranja representan clústeres espaciales significativos ($P < 0,001$).

Entre las principales conclusiones obtenidas de los trabajos epidemiológicos realizados en porcino extensivo, podemos destacar que:

- La baja seroprevalencia individual (inferior al 5%) sugiere que esta especie podría actuar como hospedador accidental más que como un verdadero reservorio de TB.
- Las elevadas prevalencias a nivel de explotación (24,8% en Andalucía y 27,9% en España), municipio y comarca ganadera, indican una amplia distribución de la TB en las explotaciones de porcino extensivo en España.

- Las variaciones espaciales en la distribución de la TB en el porcino extensivo, así como la presencia de espoligotipos compartidos con otras especies domésticas y silvestres, ponen de manifiesto la necesidad de evaluar, en función de cada escenario epidemiológico y de los métodos de diagnóstico oficiales disponibles, la posibilidad de incorporar sistemas de vigilancia en las explotaciones de porcino extensivo en los ecosistemas mediterráneos.
- Los resultados obtenidos en estos estudios pueden ser de gran utilidad para diseñar y desarrollar, en su caso, un programa de lucha frente a MTBC en esta especie, reforzando el control de la enfermedad en el ganado bovino. Sin embargo, son necesarios nuevos estudios epidemiológicos y moleculares para comprender mejor el papel de esta especie en la epidemiología de la TB en España.

Diagnóstico de la tuberculosis en el cerdo doméstico

En la actualidad, el diagnóstico de la TB en el porcino puede realizarse empleando las mismas técnicas utilizadas en otras especies (ver sección 4.2.). Entre ellas, destacan:

- **Detección de lesiones macroscópicas compatibles con infección por MTBC y estudio histopatológico.** Normalmente se realiza en matadero durante la vigilancia pasiva (Cardoso-Toset et al., 2015). El tipo de lesión (lesiones miliares, granulomas necróticos caseosos-calcificados, localizadas o generalizadas) y su localización (nódulos linfáticos submandibulares, retrofaríngeos, traqueobronquiales y mesentéricos, pulmón, bazo) es, en general, similar a las de otras especies de suidos como el jabalí (ver capítulo 4.3.6.). Aunque hay que tener en cuenta que también se han detectado lesiones en otras localizaciones (Figura 43).
- **Detección de bacilos ácido-alcohol resistentes (tinción Ziehl-Neelsen).** Debido a la similitud con otras micobacterias del MAC, para el diagnóstico asertivo directo deben incluirse otras técnicas como:
- **Cultivo e identificación molecular (espoligotipado y MIRU-VNTR).**
- **PCR convencional o qPCR a tiempo real.** En porcino, estas técnicas presentan valores de Se que oscilan entre un 80% y un 89% y de Sp entre un 86% y un 100% (Cardoso-Toset et al., 2015; Barandiaran et al., 2019).
- **IDTB.**
- **ELISA.**
- **IFN- γ .** En el estudio realizado por Pesciaroli et al. (2012), determinaron una Se del 79-85% y una Sp del 100%.

Por otro lado, la fuerte respuesta humoral que desarrollan los suidos al contacto con MTBC, hace que el uso de técnicas indirectas basadas en la detección de anticuerpos frente a MTBC a partir de la utilización de diferentes antígenos de *M. bovis* (PPD bovina, P22, MPB83, MPB70, ESAT-6, CFP-10 y Ag85-B, así como otros no comerciales), sea una herramienta de gran utilidad para la vigilancia de la enfermedad. Para el análisis serológico se han desarrollado diversos análisis inmunoenzimáticos (ELISA) e inmunocromatografías rápidas. Actualmente, existen dos ELISA comerciales, ambos desarrollados en España, para el diagnóstico serológico de TB en suidos: el TB ELISA-VK; Vacunek S.L, Derio, España (emplea PPD bovina) y el ELISA INgezim TB Porcine; Ingenasa, Madrid, España (emplea MPB83+MPB70). También se ha comercializado un test multi-especie, basado en inmunocromatografía rápida (DPP VetTB; Chembio Diagnostics Inc., Medford, Nueva York, Estados Unidos), que puede ser empleado previo registro en cerdo doméstico (Miller et al., 2019). Los resultados de Se (73-84%) y Sp (99-100%) de los ELISAs, así como los del kit DPP VetTB (Se: 92% y Sp: 100%), indican que estas técnicas pueden ser utilizadas para la vigilancia epidemiológica de la TB en el porcino, para determinar la circulación de MTBC a nivel de explotación o para realizar estudios epidemiológicos a gran escala (Cardoso-Toset et al., 2015; Miller et al., 2019; Thomas et al., 2019a).

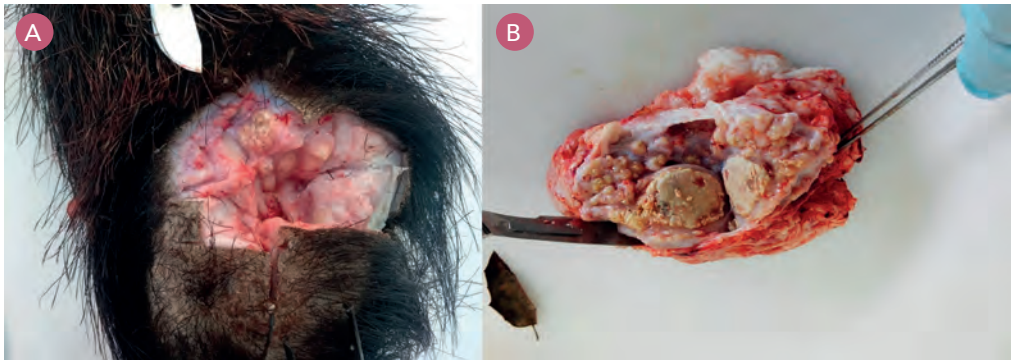


Figura 43. Lesiones macroscópicas provocadas por el complejo *Mycobacterium tuberculosis* en articulaciones de jabalí (A) y cerdo ibérico (B).

Medidas de lucha frente a la tuberculosis en el ganado porcino

Dentro de las posibilidades de intervención para el control de la TB en el ganado porcino encontramos diferentes herramientas que han demostrado su eficacia. No obstante, la lucha frente a una enfermedad tan compleja requiere un abordaje desde un punto de vista holístico, evaluando el contexto epidemiológico en el que se aplican y combinando sinérgicamente todas las medidas posibles para maximizar su eficacia.

Programas de erradicación en explotaciones porcinas

Actualmente no existe un programa de lucha de TB en el ganado porcino en España. No obstante, en los últimos años se han llevado a cabo diferentes proyectos de investigación en colaboración con empresas del sector, con el objetivo de implementar y evaluar programas sanitarios para la erradicación de la TB en las explotaciones porcinas positivas. Dichos programas se han basado en el diagnóstico de laboratorio directo e indirecto y en el sacrificio sanitario de los animales positivos. Estos programas se basan principalmente en la aplicación de dos medidas: 1) la vigilancia activa, con la toma de muestras de sangre y el análisis serológico mediante ELISA como el principal apoyo para la detección de animales seropositivos, y 2) la evaluación de lesiones macroscópicas en matadero, análisis histopatológico, cultivo microbiológico, PCR y espigotipado de los aislados, para caracterizar las especies y tipos moleculares de MTBC que circulan en las explotaciones positivas. Estas experiencias previas han tenido resultados prometedores, lográndose eliminar o disminuir la prevalencia de TB del 5,6% al 1,7% en tan solo 4 meses, en diferentes núcleos de reproductoras (datos no publicados). Sin embargo, para optimizar este tipo de programas, las actuaciones deben ser mantenidas en el tiempo y deben ir acompañadas de otras medidas de profilaxis.

Bioseguridad

La instauración de programas sanitarios para hacer frente a la TB en las explotaciones porcinas no puede entenderse sin la implementación paralela de una serie de medidas de bioseguridad. En Sanidad Animal entendemos el concepto de bioseguridad como el conjunto de medidas preventivas destinadas a evitar la entrada de un agente patógeno, la circulación dentro de una explotación y su propagación a otras explotaciones y/o especies. La producción del cerdo en extensivo posee diferentes fases y sistemas de manejo (reproducción, cría, aprimalamiento y montanera). Esto implica que los riesgos de transmisión de enfermedades pueden ser muy diferentes en cada uno de ellos; por tanto, las medidas de bioseguridad han de ser específicas para cada una de las fases del ciclo productivo (Figura 44). No obstante, de forma genérica, en una explotación porcina podemos dividir las medidas de bioseguridad en dos grupos principales. Un primer grupo, que incluye aquellas medidas destinadas a minimizar el riesgo de introducción y propagación de nuevos patógenos entre explotaciones (cuarentenas, valla perimetral, limpieza y desinfección de vehículos, control de vehículos y de personal, etc.). Y un segundo grupo que estaría conformado por las medidas que reducen la circulación de patógenos dentro de una explotación (flujos de trabajo, medidas higiénicas, correcta eliminación de cadáveres, etc.) (Simon-Grifé et al., 2013). Así mismo, dentro de este segundo grupo, y en el caso

del porcino extensivo, se encontrarían todas aquellas medidas encaminadas a promover la segregación espaciotemporal del ganado porcino con otras especies domésticas o silvestres simpátricas. Así, cuando hablamos de explotaciones mixtas con bovino y porcino, estas medidas son fundamentales puesto que se ha demostrado la existencia de una correlación entre la prevalencia de TB en el cerdo y en el ganado bovino (Pesciaroli et al., 2014). Además, estudios realizados en Estados Unidos y Australia demostraron que la implantación de este tipo de medidas aplicadas en el bovino, redujeron considerablemente la prevalencia de lesiones debidas a *M. bovis* en el porcino (revisado en Pesciaroli et al., 2014).

Como en cualquier programa de bioseguridad, para obtener resultados visibles y satisfactorios, todas estas medidas deben aplicarse de forma estricta y mantenerse en el tiempo. El principal hándicap al que se debe hacer frente cuando queremos instaurar un programa de bioseguridad efectivo radica, no tanto en la elaboración de un plan en sí, sino en su mantenimiento a lo largo del tiempo, ya que la falsa sensación de una eficacia limitada con relación al esfuerzo realizado puede llevar a su relajación o abandono. Igualmente peligrosa puede ser la relajación en las medidas si éstas resultan inicialmente eficaces. Asimismo, los riesgos de reinfección siguen siendo altos si otras explotaciones vecinas no están aplicando medidas, o dejan de aplicarlas los propios técnicos u operarios.



Figura 44. Diferentes fases y sistemas de manejo en la producción del cerdo en extensivo.
A) Montanera. B) Aprimalamiento.

Vacunación

En los últimos años se han desarrollado diferentes estrategias de vacunación para el control de la TB en el jabalí, principal reservorio natural de MTBC en los ecosistemas mediterráneos de la Península Ibérica (ver capítulo 4.3.6.). En esta especie, se ha probado con éxito la eficacia de dos vacunas orales; la BCG (Ballesteros et al., 2009a; Garrido et al., 2011; Gortázar et al., 2014) y la vacuna de

M. bovis inactivada por calor (Garrido et al., 2011; Beltrán-Beck et al., 2014a; Díez-Delgado et al., 2018). Díez-Delgado et al. (2017) consiguieron reducir un 66% las lesiones de TB en jabalíes de granja mediante la aplicación de esta vacuna por vía parenteral. Estos estudios ponen de manifiesto que la inmunoprofilaxis también podría ser una medida eficaz y complementaria en el cerdo doméstico. De hecho, Beltrán-Beck et al. (2014b) demostraron experimentalmente que la respuesta de los cerdos a la vacunación oral con *M. bovis* inactivado es similar a la descrita por Garrido et al. (2011) para el jabalí. Estos autores comprobaron que tras el desafío de los animales con una cepa virulenta de campo de *M. bovis*, en aquellos cerdos vacunados se redujeron las lesiones asociadas a TB y el aislamiento de *M. bovis* en tejidos en un 39% y en un 22%, respetivamente. Además, también se demostró que este tipo de vacunas administradas oralmente no interfieren en las pruebas de diagnóstico serológico de la TB (Beltrán-Beck et al., 2014b).

Suplementos: vitamina D

Aunque hasta la fecha no se han realizado estudios sobre el uso de suplementos alimenticios inmunoestimulantes en el cerdo doméstico, los resultados obtenidos en jabalí podrían tomarse como referencia para valorar su aplicación en el ganado porcino. Así, estudios recientes realizados en jabalíes cazados en áreas del centro, sur y oeste peninsular, demuestran una alta correlación entre formas generalizadas de TB, indicios de un escaso control inmunitario sobre la enfermedad, y niveles plasmáticos insuficientes de vitamina D₃ (Risco et al., 2016, 2019a). Estos hallazgos son consistentes con lo observado en otras especies como ciervos y bovinos (Risco et al., 2016; Benítez-Medina et al., 2018). En muchos casos, ni la exposición al sol, ni las fuentes naturales de Vitamina D₃ o sus precursores, son suficientes para que se alcancen unos niveles plasmáticos suficientes (>30 ng/ml) como para que el macrófago pueda iniciar su propia ruta de síntesis de Vitamina D₃, que es un mecanismo imprescindible para activar la fusión fagolisosomal que permitiría destruir las micobacterias fagocitadas (Lin, 2016). Por lo tanto, solo una aportación en la dieta de concentraciones suficientes de Vitamina D₃ (2.000UI/kg pienso), mantenidas en el tiempo, permitiría solventar este problema. Sin embargo, incluso en invierno y primavera es difícil que los animales mantenidos en extensivo muestren mucho interés por piensos enriquecidos si tienen alimentación natural disponible (Risco et al., 2019a).

Las experiencias con jabalíes manejados demuestran una recuperación de niveles suficientes de esta vitamina cuando se alimentan solo con pienso enriquecido, lo que hace pensar que, al menos en las primeras fases de la producción del cerdo con alimentación a pienso, la suplementación podría ser un buen procedimiento para reforzar la eficacia de su sistema inmunitario, tanto para la TB como para cualquier otra enfermedad.

4.3.5. Los cérvidos

José Ángel Barasona, Antonio Carpio, Ignacio Vargas, José Manuel Benítez-Medina, David González

Especies, distribución espacial y abundancia

Desde una perspectiva ecológica, la elevada biodiversidad presente en la Península Ibérica está relacionada con una gran variedad de usos tradicionales del territorio, particularmente aquellos asociados a los sistemas agrarios y forestales. Por ello, observamos una elevada extensión de espacios seminaturales en los que habita gran parte de la fauna autóctona. Las tres especies de cérvidos que serán abordadas en este capítulo, ordenadas por su relevancia epidemiológica frente a la TB en la Península Ibérica son el ciervo común o rojo (*Cervus elaphus*), el gamo (*Dama dama*) y el corzo europeo (*Capreolus capreolus*). Son especies cinegéticas que constituyen un importante recurso natural, cuya extensión en muchas áreas geográficas europeas las convierten en un adecuado instrumento de conservación del medio natural, así como de fomento del desarrollo rural y socio-económico. Además, en los últimos años se ha puesto de manifiesto un gran interés por la pseudo-domesticación y la cría de estas especies de cérvidos con diferentes grados de intensificación (Mysterud, 2010; Figura 45).



Figura 45. Manejo del ciervo en cautividad mediante instalaciones específicas y sistema de mangas.

Después de un nivel mínimo estimado a principios del siglo XX, las poblaciones de cérvidos han aumentado y recolonizado grandes áreas en Europa durante las últimas décadas siguiendo un fenómeno multicontinental (Milner et al., 2006; Burbaiteé y Csányi, 2009). Las poblaciones actuales de ungulados han alcanzado situaciones de sobreabundancia en algunas áreas, lo que a su vez puede tener efectos perjudiciales sobre la biodiversidad y la función del ecosistema (Apollonio et al., 2010). Como ejemplo, el ciervo es la especie mejor estudiada y, junto con el corzo y el jabalí, la especie de ungulado europeo más extendida, encontrándose en la mayor parte de Europa continental y las islas británicas. La distribución del ciervo en el noreste y sur peninsular se cuadruplicó entre 1960 y 1998 (Gortázar et al. 2000; Acevedo et al. 2011), con densidades poblacionales que en la actualidad pueden alcanzar más de 40 individuos/km² (Acevedo et al., 2008), ocupando España el primer lugar en Europa en número de ciervos capturados (Apollonio et al., 2010). Esta expansión generalizada ha sido facilitada por diversos factores tanto directos (vallado, translocaciones con fines cinegéticos o uso de suplementación alimentaria) como indirectos (cambios en los usos del suelo, en la demografía humana o ausencia de depredadores naturales), la mayoría de ellos como consecuencia de la actividad humana (Martínez-Jaúregui y Herruzo, 2014). También ha ayudado el hecho de que en España se caza menos del 20% anual de los efectivos, cuando una población de ciervo estable requiere extraer entre el 25 y el 30% anualmente (SaBio IREC, datos no publicados).

El corzo europeo es la especie más numerosa de ungulado del continente, con un número estimado de 10 millones de corzos en Europa (Apollonio et al., 2010). En España esta especie se encuentra fundamentalmente en la mitad norte (Figura 46), donde varios trabajos previos muestran una densidad poblacional entre 4-7 corzos/km² (Acevedo et al., 2010; Horcajada-Sánchez et al., 2018). Sin embargo, esta especie ha sido objeto de diferentes programas de reintroducción (1971–2008) en el norte de España (Torres et al., 2016). El corzo es una valiosa especie de caza (Apollonio et al., 2010), con más de 64.000 corzos cazados en España en 2017.

Por último, el gamo, aunque es la especie menos numerosa y distribuida de las tres (Figura 46), se reintrodujo en muchas áreas mediterráneas con fines de caza (Braza, 2017). A menudo se considera que entre los cérvidos, la distribución actual del gamo es la más influenciada antropogénicamente (Baker et al., 2017). Esta especie puede ser localmente muy abundante debido a las acciones de manejo intensivo y a su comportamiento gregario, alcanzando densidades poblacionales de 28,5 individuos/km² (Duarte et al., 2015). Hay escasos datos sobre el tamaño y composición de las poblaciones de gamos repartidas por España. Se ha estimado su abundancia en 0,06 individuos/100 ha en poblaciones de Burgos, 3 individuos/100 ha en Montes de Toledo y 2,55 individuos/100 ha en Cazorla y Segura (ver Braza, 2017); aunque los datos de abundancia más fiables de los que

se dispone para esta especie son los recogidos en Doñana, donde las densidades de gamo oscilan entre 1,7 individuos/ha (praderas húmedas) y 0,06 individuos/ha en la marisma (Braza, 2017). Recientemente esta especie también ha sido registrada en Mallorca (Pinya y Lassnig, 2018). El Anuario Forestal de Estadística muestra un cupo de 25.000 capturas en 2017 para esta especie.

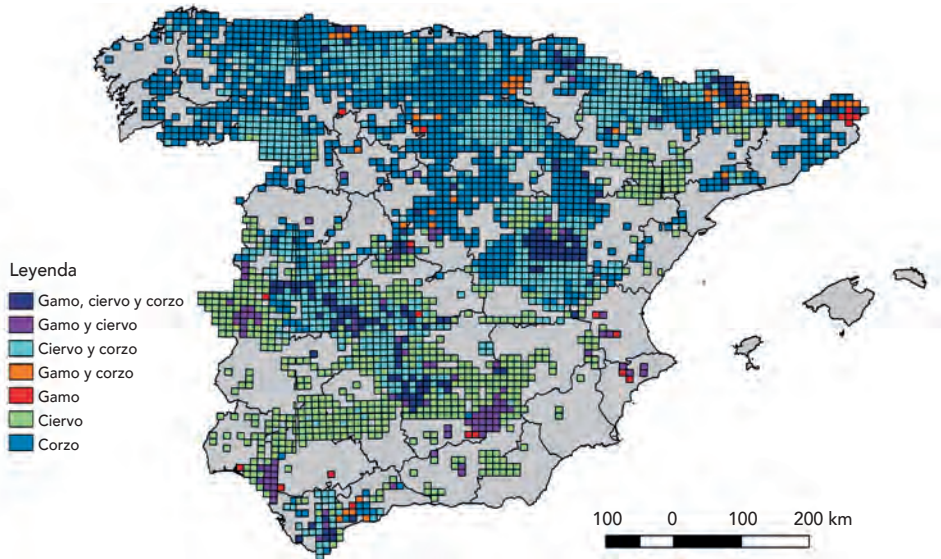


Figura 46. Distribución de las tres especies de cérvidos en la Península Ibérica. Datos del inventario español de especies terrestres.

El papel de los cérvidos como hospedadores de la tuberculosis

Mycobacterium bovis se ha detectado en un amplio rango de especies de la familia *Cervidae* en todo el mundo incluyendo, además de las descritas previamente, *Cervus nippon*, *C. unicolor*, *Odocoileus virginianus*, *O. hemionus*, *Axis Axis*, *Muntiacus reevesi*, *Rangifer tarandus*, o *Alces alces*. A pesar de representar un riesgo teórico, diversos factores como la naturaleza de la enfermedad, la prevalencia de la infección y el comportamiento del hospedador requieren una precisa evaluación antes de que una especie en particular se pueda considerar como un riesgo significativo para el ganado (Corner, 2006). Actualmente, la información que vincula a los cérvidos silvestres como fuente de infección o reinfección del ganado es principalmente asociativa, y tan solo para un número limitado de especies se describen evidencias convincentes de la transmisión de *M. bovis* al ganado bovino. De esta forma, la relevancia epidemiológica será variable dependiendo de las especies, las áreas geográficas y el manejo.

La importancia de los cérvidos en el mantenimiento y transmisión de *M. bovis* se conoce desde hace varias décadas, especialmente en el ciervo de cola blanca (*O. virginianus*) en América, el cual ha sido ampliamente reconocido como el principal reservorio silvestre en el norte de este continente (Gilsdorf y Kaneene, 2014). De hecho, los focos endémicos en esta especie están dificultando actualmente los programas de erradicación de TB en ganado de varias regiones de Estados Unidos y Canadá (Palmer et al., 2015). Aunque los brotes severos de TB no son comunes en poblaciones de cérvidos silvestres, esta situación puede ocurrir ocasionalmente en condiciones de cautividad, con un elevado número de animales infectados, presentando lesiones generalizadas en las regiones torácica (Figura 47) y abdominal (Waters et al., 2011c).

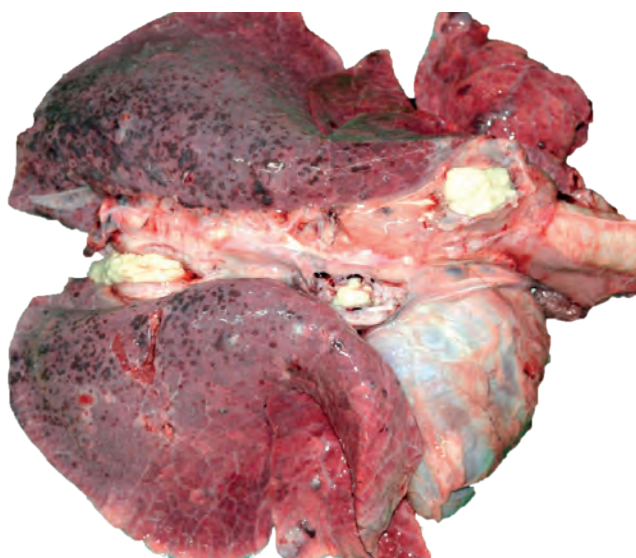


Figura 47. Lesiones tuberculosas en cérvido. Órganos torácicos de un gamo (*Dama dama*) cazado con lesiones encapsuladas de consistencia caseosa debido a la infección por *Mycobacterium bovis*, confirmada por cultivo bacteriológico en pulmón, nódulo linfático bronquial y mediastínico.

En los hábitats mediterráneos de la Península Ibérica, existe un sistema multi-hospedador, donde la transmisión de *M. bovis* entre tres especies de ungulados silvestres (jabalí, ciervo y gamo) contribuye al mantenimiento de la infección en el medio natural (Gortázar et al., 2008). Aunque el reservorio silvestre más importante en este sistema es el jabalí (Naranjo et al., 2008), el ciervo y el gamo se consideran reservorios reales en áreas donde son abundantes (Figura 48). La prevalencia media de infección confirmada por cultivo bacteriológico es variable, pero según las zonas alcanza el 36% en ciervo y el 18% en gamo (Tabla 11; Barasona et al., 2014a) aunque localmente se pueden aproximar al 50%. De hecho, en elevadas

densidades y en las circunstancias particulares de los entornos mediterráneos, el ciervo y el gamo pueden mantener la circulación de *M. bovis* en ausencia de ganado doméstico, por ejemplo, en fincas cercadas o en áreas naturales protegidas sin rumiantes domésticos (Gortázar et al., 2008).



Figura 48. Contacto entre rumiantes domésticos y silvestres.
Imagen de un grupo de gamos compartiendo el mismo pastizal, al mismo tiempo, que un rebaño de bovino en extensivo.

En cuanto a los hábitats continentales y atlánticos, se detectan menos casos de infección por *M. bovis* entre cérvidos silvestres (prevalencia media de 2% en ciervo y 8% en gamo) en comparación a los sistemas mediterráneos (Tabla 11), a pesar de que se han realizado muestreos intensivos a nivel local (Gortázar et al., 2017). Sin embargo, los brotes de TB en ciervos de varias regiones del oeste de Francia muestran que se pueden alcanzar también unas tasas elevadas de prevalencia en situaciones de sobreabundancia en ambientes atlánticos (Zanella et al., 2008).

Tabla 11. Tabla comparativa entre las tasas de prevalencia de tuberculosis descritas en cérvidos del norte y centro-sur de la Península Ibérica.

Zona	Especie	Muestreados (positivos)	Prevalencia (IC95%)	Fuente
Norte	Ciervo (<i>Cervus elaphus</i>)	1515 (34)	2,24% (1,8–3,3)	Gortázar et al., 2017 Balseiro et al., 2009
	Gamo (<i>Dama dama</i>)	135 (11)	8,14% (4,3–13,9)	
	Corzo (<i>Capreolus capreolus</i>)	183 (1)	0,54% (0-3,1)	
Centro y Sur	Ciervo	2949 (327)	11,09% (10,8-11,2)	Vicente et al., 2013
	Gamo	644 (88)	13,66% (13-14,4)	Barasona et al., 2014a, 2019
	Corzo	54 (1)	1,9% (0-5,6)	García-Bocanegra et al., 2012

A pesar de la creciente distribución y densidad del corzo en muchas regiones europeas, la TB es ocasional (<1,5%) en esta especie como demostraron Balseiro et al. (2009) tras inspeccionar 227 corzos en diferentes áreas de Italia y España, donde se habían descrito previamente dos casos esporádicos en esta especie. Del mismo modo, en Francia se realizó un muestreo de 668 corzos en áreas endémicas de TB, donde tan solo se encontraron siete animales infectados por *M. bovis* (Lambert et al., 2017). De acuerdo con estos resultados y el patrón patológico-lesional observado (principalmente lesiones pulmonares), el corzo no parece ser un reservorio de TB significativo. Varios estudios argumentan esta resistencia del corzo a la infección debido a diversos factores etológicos propios de la especie. En este sentido, el corzo es menos gregario que otras especies de ungulados y su comportamiento alimentario también difiere: ramonea selectivamente sobre matorrales, lo que reduce el potencial de mantenimiento de la enfermedad y las oportunidades para contraer la infección por contaminación ambiental, siendo éstas bajas respecto a especies silvestres y domésticas simpátricas más pasteadoras (Delahay et al., 2007).

Tendencias temporales y factores de riesgo de la tuberculosis en cérvidos

Hasta el momento existen pocos datos sobre las tendencias temporales en la prevalencia de TB en los cérvidos en España. En Extremadura se detectó un aumento del 100% de la prevalencia de lesiones compatibles con TB en la inspección de ciervos abatidos en eventos cinegéticos entre 1997 y 2002 (Parra et al., 2006). En el Parque Nacional de Doñana, donde seguramente se ha estudiado con más detalle este patógeno en un sistema multi-hospedador, este incremento ha sido más suavizado en ciervo, desde una prevalencia media del 21% durante 1998-2003 hasta del 35% durante 2006-2012. En cambio se ha observado un ligero descenso de gamos infectados, desde un 26% durante 1998-2003 hasta un 18% durante 2006-2012 (Romero et al., 2008; Barasona et al., 2014a). No obstante, los datos actuales sobre la prevalencia de TB a gran escala en cérvidos abatidos sugieren una situación generalmente estable en gran parte de la Península Ibérica, como se ha demostrado en la provincia de Ciudad Real (Vicente et al., 2013).

Por su parte, existen múltiples evidencias científicas que señalan a los cérvidos como fuente de infección o reinfección para el ganado bovino, partiendo desde estudios moleculares hasta metodologías de campo. En el centro y sur de la Península Ibérica, se han realizado varios estudios que detallan cómo los cérvidos comparten las mismas variantes genotípicas de *M. bovis* que el ganado bovino (Parra et al., 2005; Gortázar et al., 2011). De hecho, en el Parque Nacional de Doñana se ha documentado la disminución de la diversidad molecular del MTBC en ganado, provocado por el sacrificio de bovinos positivos durante un periodo

continuo de 10 años, mientras que esta diversidad se mantiene en ciervo, gamo y jabalí, donde no se realiza una eliminación selectiva (Gortázar et al., 2011). Además, se han observado asociaciones espacio-temporales significativas entre la alta densidad de cérvidos –junto a la agregación en puntos de riesgo (Figura 49)- y el mantenimiento de la incidencia de TB en ganado bovino, medido a diferentes escalas (Rodríguez-Prieto et al., 2012; Barasona et al., 2014a). Este es el caso de Andalucía, Extremadura, Castilla-La Mancha o Portugal, donde los cambios en el manejo de la fauna cinegética (hacia modelos más intensivos, con uso de vallados y suplementación de alimento) complican cada vez más la epidemiología y el control de la TB (Cunha et al., 2011).



Figura 49. Agregación espacial de un grupo de gamos en una región del sur de España.
Imagen obtenida mediante un dron (Proyecto Aeromab).

Diagnóstico de la tuberculosis en los cérvidos

Las técnicas de diagnóstico actuales empleadas para detectar TB en los cérvidos se basan en las mismas técnicas de diagnóstico en bovino (sección 4.2.). Estas técnicas se utilizan tanto para el diagnóstico *ante mortem* como para el *post mortem*.

Diagnóstico ante mortem

Las técnicas de diagnóstico *in vivo* se basan en la evaluación de la respuesta inmune mediada por células producida contra el MTBC, ya sea *in vivo* (IDTB) o *in vitro* (IFN- γ). La prueba de detección *ante mortem* estándar aprobada por la OIE para la detección de TB en ciervos en explotaciones cinegéticas es la prueba de IDTBs, con una Se del 82-86% y una Sp del 46-76% en ciervos (Palmer et al., 2011). Además de la baja Sp, esta técnica tiene algunos inconvenientes (Fernández-de-Mera et al., 2009; Queirós et al., 2012), incluida la necesidad de manejar a los animales dos veces en un periodo de 72 h. La prueba IFN- γ , que también detecta la respuesta inmune mediada por células, requiere solo una muestra de sangre, pero es más exigente en términos de logística y habilidades del operador (Risalde et al., 2017). A medida que la enfermedad progresa, la respuesta inmune mediada por células tiende a disminuir al mismo tiempo que se desarrolla una respuesta de anticuerpos (McNair et al., 2007). Las técnicas de detección de anticuerpos, como los ensayos ELISA y las pruebas rápidas inmunocromatográficas pueden, por lo tanto, ser útiles como métodos alternativos o pruebas paralelas a los ensayos de diagnóstico celular de TB en cérvidos (García-Bocanegra et al., 2012).

El derivado de proteína purificada de *M. bovis* (PPD bovina) es el cóctel de antígeno más utilizado en los ELISA de TB (Bezós et al., 2014), aunque puede dar lugar a reacciones cruzadas debido a la homología entre *M. bovis* y otras micobacterias ambientales (Infantes-Lorenzo et al., 2017). Por ello, se han probado antígenos más específicos, como MPB70, MPB83, ESAT-6 o CFP-10, en ensayos serológicos para mejorar la Sp. Recientemente se ha demostrado que una nueva proteína subcompleja inmunopurificada de PPD bovina, denominada P22 (CZ Veterinaria SL, Porriño, España) y que está compuesta por varios antígenos, incluidos MPB70, MPB83, ESAT-6 y CFP-10, es una posible alternativa adecuada a la PPD bovina (Infantes-Lorenzo et al., 2017).

Diagnóstico post mortem

Diagnóstico patológico

Se basa en la detección de lesiones macroscópicas compatibles con TB y su estudio histopatológico. Las lesiones tuberculosas son bastante características en cérvidos, observándose con más frecuencia en los nódulos linfáticos retrofaríngeos, traquebronquiales y mesentéricos. Además se suelen ver afectados los pulmones y las serosas. En los cérvidos predominan las lesiones de color blanco-amarillento y consistencia purulenta o caseosa, sin llegar a calcificar tanto como en otras especies. Normalmente, el centro purulento-caseoso está cubierto con una cápsula fibrosa conjuntiva de grosor variable. La presencia de granulomas

mal encapsulados se ha asociado a una mayor tasa de excrección, con la consiguiente contaminación del ambiente y posibilidad de transmisión a otras especies (Johnson et al., 2008). El tamaño de las lesiones varía, desde tan pequeñas que pueden pasar desapercibidas a simple vista (miliares), hasta ocupar gran parte de un órgano (Figura 47). El corte seriado de órganos y tejidos resulta vital para detectar las lesiones contenidas en un tejido. Por su parte, las características histopatológicas de las lesiones tuberculosas en los cérvidos son similares a las observadas en los tejidos bovinos (García-Jiménez et al., 2012). Este tipo de diagnóstico está dirigido a la vigilancia activa y pasiva en eventos cinegéticos.

Diagnóstico microbiológico

- i) Cultivo: la tasa de aislamiento mediante cultivo bacteriológico a partir de muestras de animales que están realmente infectados puede ser baja, pues depende de multitud de factores, relacionados tanto con el animal (fase de la infección, carga bacteriana, etc.) como con la inspección y muestreo en acciones cinegéticas y en el matadero, que ha de ser lo más completa posible. La Se del cultivo cuando se parte de muestras con lesiones macroscópicas compatibles con TB es aproximadamente del 85%, disminuyendo significativamente cuando no existen lesiones visibles (Courcoul et al., 2014).
- ii) Una posible alternativa al cultivo es la PCR directa en tejido (Courcoul et al., 2014), una técnica que ya emplean algunos laboratorios en el ámbito de la investigación en TB, pero cuyos buenos resultados hacen pensar que pueda llegar a incluirse de manera oficial en los programas de erradicación en un futuro cercano. Esta técnica puede ofrecer una Se similar o incluso superior al cultivo tradicional (87,7%) y una Sp del 97%, dependiendo del tipo de muestra de origen.

Opciones de prevención y control de la tuberculosis en cérvidos

Como en otras infecciones compartidas, la erradicación total de la TB no sería posible si no se tienen en cuenta los reservorios silvestres. De aquí la necesidad de implementar estrategias de manejo y control que permitan reducir la transmisión del agente patógeno entre la fauna silvestre y el ganado doméstico (Thirgood, 2009). En general, este control suele ser controvertido ya que a menudo consiste en intervenir en sistemas más o menos naturales. Un elemento clave, previo a poder controlar la TB en los cérvidos, es establecer un apropiado sistema de vigilancia, incluso cuando la opción elegida sea la de no tomar medidas. Realizada de modo adecuado, la vigilancia permite identificar los cambios en la aparición de la enfermedad y evaluar el impacto de cualquier intervención.

Entre todas las posibilidades de prevención y control de la TB encontramos diferentes herramientas que han demostrado su eficacia en poblaciones de cérvidos. De cualquier forma, el control dependerá del manejo de estas especies (granjas cinegéticas, fincas valladas, áreas protegidas...) y de su papel epidemiológico en cada escenario concreto. Las posibilidades de control de TB en cérvidos se podrían resumir en:

- El sacrificio selectivo basado en la prueba por IDTB, que se realiza fundamentalmente en granjas cinegéticas, núcleos zoológicos y similares, debido a la posibilidad de llevar a cabo un control sanitario individual gracias a la identificación de los animales y a un manejo intensivo. La realización de la IDTB está planteada de forma anual en los animales reproductores que tengan una edad superior al año, debiéndose sacrificar aquellos que sean positivos a dicha prueba. En Estados Unidos se han evaluado también métodos serológicos como pruebas determinantes del sacrificio (Cosgrove et al., 2012). El objetivo es realizar saneamientos similares a los realizados en las granjas de animales domésticos.
- Gestión cinegética responsable para evitar la sobreabundancia, por sus implicaciones sanitarias y ecológicas. Fundamentalmente consiste en el control de las poblaciones de cérvidos por medio de la eliminación o el manejo del hábitat. Por un lado, se permite un aumento de los cupos, modalidades o temporada de caza para conseguir una reducción en el número de individuos, tratando de eliminar individuos visiblemente enfermos y de edad avanzada. Sin embargo, este criterio no siempre se puede llevar a cabo y se suele realizar de forma aleatoria. Otra práctica relevante es el manejo del hábitat, que incluye la disminución o la eliminación de la suplementación de alimento. Esta práctica tiene una doble función: por un lado, reducir la agregación en torno a los puntos de alimentación, que favorecería la transmisión del agente patógeno, y, por otro lado, limitar los recursos disponibles reduciendo la densidad de las poblaciones. En Michigan (Estados Unidos), se consiguió una reducción significativa del nivel de la prevalencia de TB en el ciervo de cola blanca combinando el control de la población y la prohibición de la suplementación alimentaria (O'Brien et al., 2011b).
- La prevención en la interfaz con el ganado abarca un amplio campo que incluye aspectos como el control de los traslados, la eliminación higiénica de cadáveres, la gestión de residuos derivados de la actividad cinegética, el uso de vallados, la gestión de suplementación alimentaria, la gestión de los puntos de riesgo de interacción y la bioseguridad en las explotaciones de ganado, entre otras. Las medidas preventivas tienen como objetivo mejorar la bioseguridad mediante la reducción o evitación de las interacciones entre el reservorio silvestre, el ganado y el ambiente. El control de

los traslados es fundamental para el control de la TB en los cérvidos. En España existe legislación específica, el Real Decreto 1082/2009, por el que se regula el movimiento de especies cinegéticas libres de TB, entre otras infecciones. Otro elemento importante en la bioseguridad y el control de la TB es la correcta retirada de los cadáveres (Figura 50) y los residuos de los animales cazados (incluyendo vísceras) para limitar la diseminación de *M. bovis* (Cano-Terriza et al., 2018b).



Figura 50. Cadáver de una cierva con lesiones generalizadas por tuberculosis en una charca que utiliza frecuentemente el ganado bovino. Retirar rápidamente estos cadáveres es fundamental para reducir el riesgo de transmisión de *Mycobacterium bovis* al ganado bovino.

Además, existen infinitas posibilidades en cuanto a cambios en el manejo para resolver problemas de bioseguridad específicos. Una de las medidas más populares es el uso de barreras que limiten el contacto entre especies. Este concepto incluye el vallado, a gran y pequeña escala, así como otro tipo de barreras físicas o disuasorias. Actualmente se está incrementando la bioseguridad localmente en las ganaderías extensivas, donde es probable el contacto con fauna silvestre en pastos, puntos de agua o almacenes de alimento. Como ejemplo, en el parque nacional de Riding Mountain (Canadá) el vallado a nivel local y la prohibición de la alimentación suplementaria se combinó con el uso de perros pastores para reducir el riesgo de transmisión

de *M. bovis* por cérvidos al ganado (O'Brien et al., 2011a, 2011b). Otro ejemplo en una explotación de bovino en extensivo del sur de España fue la combinación de diferentes sistemas de vallado y puertas selectivas que logró modificar el acceso a los puntos de agua, de manera que fueran selectivos para el ganado bovino o los ungulados silvestres, respectivamente, segregando así ambos grupos (Barasona et al., 2013). Se comparó la incidencia de TB en bovinos de esta explotación antes y después de actuar, obteniéndose una reducción significativa de bovinos positivos a TB tras la intervención.

- La vacunación para reducir la prevalencia de enfermedad en cérvidos es un área de investigación en curso. La mayor parte de los estudios se centran en el uso de la BCG, ya sea por vía parenteral o por vía oral. Recientemente se ha demostrado que la vacunación oral con *M. bovis* inactivado por calor reduce el riesgo de lesiones de TB en ciervos desafiados con una cepa de campo sin interferir con el diagnóstico *in vivo* de la infección (Thomas et al., 2017). Estas alternativas se encuentran actualmente en desarrollo y evaluación.

4.3.6. El jabalí

Remigio Martínez, Christian Gortázar

El jabalí (*Sus scrofa*) es el ancestro del cerdo y, como éste, pertenece al orden *Artiodactyla*, familia *Suidae* y género *Sus*. Se distribuye por casi toda Eurasia y norte de África, y ha sido introducido en muchas otras regiones. Se trata de un mamífero omnívoro que muestra preferencia por alimentos energéticos como las bellotas o el maíz. Originario de ambientes forestales, se adapta bien a cualquier terreno que le ofrezca refugio y alimento. Es precoz y prolífico: las hembras pueden alcanzar la edad reproductora mucho antes de cumplir el primer año de vida, para gestar entre 4 y 6 crías. Los rayones sufren una mortalidad elevada por enfermedades y por depredación, pero a partir de los 6 meses la caza se convierte en el principal regulador de sus poblaciones. Aunque puede vivir más de diez años, la esperanza media de vida del jabalí es muy inferior, sobre todo en terrenos con alta presión extractiva o en presencia de TB.

Densidad y distribución en España

El jabalí se encuentra distribuido por toda la Península Ibérica. Nada menos que 14 provincias registraron más de 10.000 jabalíes cazados en la temporada 2017/2018. Los valores más extremos se dieron en el noreste, con Huesca a la cabeza, donde se cobraron 30.639 ejemplares: lo mismo que se cazaba en toda España hace 40 años.

El número de jabalíes cazados en España se viene duplicando cada 10 años (Figura 51), lo que implica un crecimiento exponencial de sus poblaciones. De una forma simplista, el número total de jabalíes podría calcularse multiplicando por 3-4 el número de ejemplares abatidos. Es decir, que en 2017/2018 había en España entre 1.162.000 y 1.550.000 jabalíes. Y lo que es peor, parece probable que en los próximos años se supere el medio millón de jabalíes cazados, que a su vez equivaldría a una población total entre 1,5 y 2 millones. Por Comunidades Autónomas, todas menos las insulares cuentan con resultados de caza en aumento en los últimos cinco años. Los mayores incrementos se corresponden a Murcia (199%), Cataluña (190%) y Navarra (178%).

Las poblaciones españolas de jabalí, al igual que ocurre en otros países, crecen de forma generalizada. Y la previsión es que continuarán haciéndolo, aunque es difícil identificar las causas de este crecimiento tan continuado. Por apuntar algunas, cabría señalar, en primer lugar, los cambios que se han producido en el medio rural: el reciente aumento de la superficie forestal (30% en 15 años) y el aumento de los cultivos de regadío como el maíz, favorecen al jabalí al proporcionarle tanto refugio como alimento. Además, la presión cinegética sobre el jabalí, a pesar de ser elevada, resulta insuficiente para contrarrestar su capacidad de multiplicación (Garrido et al., 2019).

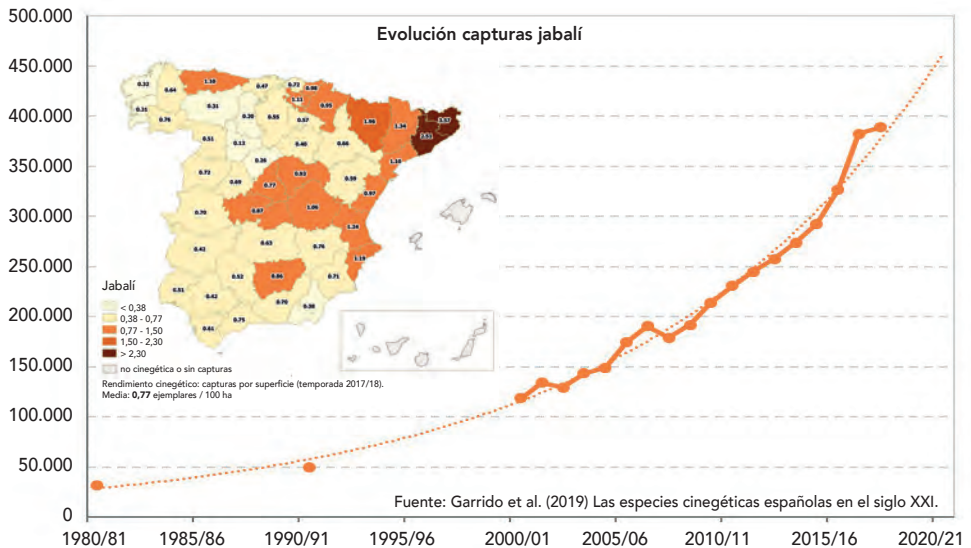
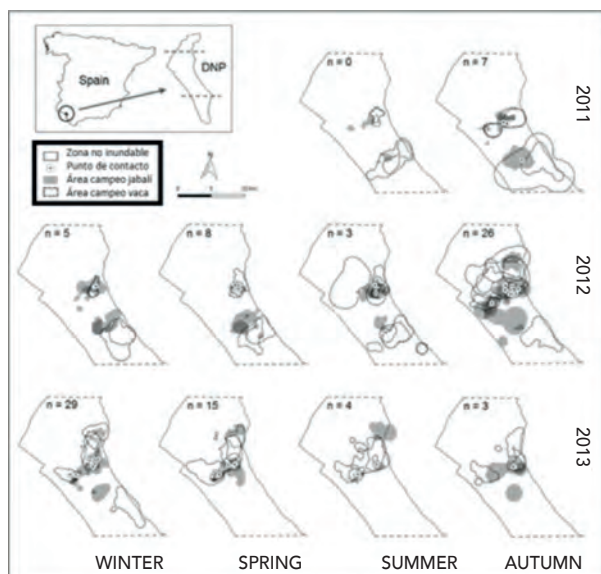


Figura 51. Evolución de capturas de jabalí declaradas en España (1980-2017). La línea punteada indica la curva de tendencia. El mapa muestra las capturas medias por provincia (por km²) en la temporada 2017/18.

Movilidad

Los jabalíes forman grupos matriarcales a los que pueden asociarse machos en los periodos de celo. Los grupos matriarcales están formados por un número variable de hembras y sus respectivos rayones (individuos menores de 6 meses) o bermejós (hasta 12 meses). La mayoría de los machos mayores de 12 meses, y también algunas hembras, se dispersan en busca de nuevos territorios. El tamaño del área de campeo dependerá de la distribución y estacionalidad de los recursos, principalmente del alimento, así como de las molestias tales como la caza. Lo habitual son movimientos de pocos kilómetros, pero existen observaciones esporádicas de movimientos superiores a los 100 km. Pocas barreras se le resisten: los jabalíes son capaces de atravesar ríos caudalosos e istmos de varios kilómetros a nado, cruzan la mayor parte de los vallados y suponen un peligro en carreteras y autovías. Con frecuencia visitan explotaciones ganaderas en busca de lombrices y otros invertebrados, pienso u otros recursos (Figura 52).



Jabalíes y vacas en Doñana

La figura presenta las áreas de campeo estacionales (Kernel 95%) de 14 jabalíes y 12 vacas con collar GPS en Doñana (DNP). También se muestran el número (n) y la ubicación de las interacciones interespecíficas detectadas. El estudio de Triguero-Ocaña et al. (2019; de acceso libre en <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211216.g001>), encuentra que cada jabalí interactuó con una vaca 1,5 veces por día; que la frecuencia de interacción fue significativamente mayor durante las horas crepusculares y en primavera y otoño, probablemente debido a una mayor agregación individual en torno a los recursos compartidos; y finalmente, que la frecuencia de interacción fue mayor cerca de recursos compartidos tales como puntos de agua.

Figura 52. Interacciones entre jabalíes y vacas en el Parque Nacional de Doñana. Figura modificada de Triguero-Ocaña et al. (2019).

El jabalí como hospedador de tuberculosis

El jabalí es un excelente indicador de la presencia de MTBC en su entorno, dado que es altamente susceptible a la infección y dado que existen técnicas sencillas y accesibles para el diagnóstico de TB en esta especie. En ambientes mediterráneos de España y Portugal, el jabalí constituye además un importante reservorio de MTBC. Aunque los aislamientos más comunes son de *M. bovis* y *M. caprae*, recientemente se ha detectado también *M. microti* en jabalíes del Valle de Arán (Pérez de Val et al., 2019). Además, es frecuente aislar miembros del MAC y otras micobacterias no tuberculosas. El jabalí mantiene altas prevalencias de infección incluso en ausencia de contacto con otros hospedadores, como por ejemplo en granjas y cercones (Naranjo et al., 2008). La infección puede tener lugar a edades muy tempranas, durante el primer verano de vida, y tiende a producir lesiones generalizadas con afección del pulmón en la mitad de los individuos infectados, principalmente a partir del primer año de vida. La presencia de coinfecciones de otros patógenos, como *Circovirus* porcino tipo 2 o *Metastrongylus* spp., incrementa la prevalencia de TB y agrava la enfermedad, favoreciendo la presencia de lesiones generalizadas (Risco et al., 2013, 2014). En zonas de alta prevalencia, la TB causa un tercio de la mortalidad anual de los jabalíes mayores de 12 meses (Barasona et al., 2016).

Los jabalíes con infección confirmada presentan ADN del complejo en el 18-54% de los hisopos oronales y en el 5-26% de las muestras fecales. Se han encontrado además casos de excreción de ADN por vía urinaria. Un tercio de los jabalíes infectados presenta cantidades importantes de ADN (concentraciones $>10^3$ UFC/gr o ml), pudiendo ser considerados "superexcretores" (Santos et al., 2015a). La probabilidad de excretar micobacterias del MTBC aumenta en presencia de coinfecciones como *Circovirus* porcino tipo 2 o *Metastrongylus* spp. (Risco et al., 2019b). Estos "superexcretores" con TB generalizada son probablemente los principales diseminadores de MTBC en espacios naturales y en explotaciones ganaderas vecinas.

No obstante, el papel del jabalí como hospedador del MTBC fuera de las regiones mediterráneas de alta prevalencia está aún por definir. En la España atlántica se encuentran prevalencias superiores al 5% por cultivo y serología. Esta situación puede cambiar con el tiempo, teniendo en cuenta las crecientes densidades poblacionales y los diversos cambios en el entorno.

Distribución de las lesiones

Los nódulos linfáticos mandibulares son la principal muestra de elección para el diagnóstico de TB en el jabalí y en el ganado porcino, tanto por histopatología como por cultivo. Más del 90% de los jabalíes confirmados como

infectados mediante cultivo presentan lesiones en los nódulos linfáticos mandibulares (Figura 53). Son fáciles de localizar y suficientemente accesibles para permitir su muestreo, aún antes de que se proceda al eviscerado. Si es preciso aumentar la Se en el cultivo, resulta conveniente resecar también las tonsilas del paladar blando. Desde el punto de vista epidemiológico es interesante conocer, además, el porcentaje de jabalíes que presentan lesiones generalizadas. Éstos se definen como aquellos individuos que presentan lesiones en más de una región anatómica, normalmente la torácica además de la cervical. El porcentaje de jabalíes con lesiones tuberculosas generalizadas puede variar entre poblaciones del 0 al 70%. Por lo tanto, además de inspeccionar los nódulos linfáticos mandibulares y otros de la región craneal-cervical, se inspeccionarán las vísceras torácicas y abdominales. En la cavidad torácica se inspeccionarán detalladamente los nódulos linfáticos torácicos, principalmente el bronquial izquierdo (fácil de localizar bajo el cayado de la aorta), el bronquial derecho (traqueal) y el mediastínico, así como todos los lóbulos pulmonares. En la cavidad abdominal se prestará atención al bazo, al hígado y nódulo linfático hepático, así como a los nódulos linfáticos mesentéricos.

Diagnóstico y control

Es importante disponer de una técnica de diagnóstico de elección basada en muestras sencillas de obtener y manejar, comparativamente poco costosa, homogénea entre laboratorios y suficientemente específica. Otros métodos pueden emplearse de forma complementaria con fines epidemiológicos.

El método de elección, en este caso, es la prueba ELISA. Esta técnica cuenta con diversas variantes, algunas de ellas comerciales. En cualquier caso, es prudente indicar en los resultados cuál de las variantes de ELISA se ha utilizado en cada situación.

Como métodos complementarios cabe señalar la patología y la microbiología. La patología permite conocer la proporción de individuos con lesiones compatibles con TB, para lo que basta con inspeccionar los nódulos linfáticos mandibulares (Figura 53). Además, una inspección completa permitirá determinar si se trata de casos generalizados, lo que presenta gran importancia epidemiológica y de salud pública. El cultivo, por su parte, permite complementar la información con aquella derivada del eventual tipado molecular de los aislados. Las posibles medidas de control de la TB en esta especie puede encontrarse en el capítulo 4.2.2. de este libro.



Figura 53. Lesiones tuberculosas en jabalí.
Nódulo linfático mandibular con lesión compatible con tuberculosis.

4.3.7. El tejón

Ana Balseiro, Francisco Javier Salguero, Marta Barral, Miguel Prieto

El tejón Europeo (*Meles meles*) pertenece al orden *Carnivora*, familia *Mustelidae* y género *Meles*. Esta especie se encuentra distribuida ampliamente por toda Europa (Figura 54), con unas densidades muy altas de población en las islas británicas y el centro y norte de Europa. El tejón es un animal de una gran adaptabilidad para vivir en una amplia variedad de ecosistemas, el ideal incluye los bosques caducifolios y las coníferas mezclados con campos abiertos. En el norte de España es muy frecuente encontrarlos en hábitats de riberas así como en tierras mixtas de cultivo, bosques y pastizales. Para crear sus tejoneras prefieren suelos bien drenados, fáciles de excavar, relativamente tranquilos y libres de presencia humana; prefieren también las zonas con abundante matorral con el que pueden camuflar sus tejoneras, encontrando ocasionalmente cobijo en las construcciones rurales.

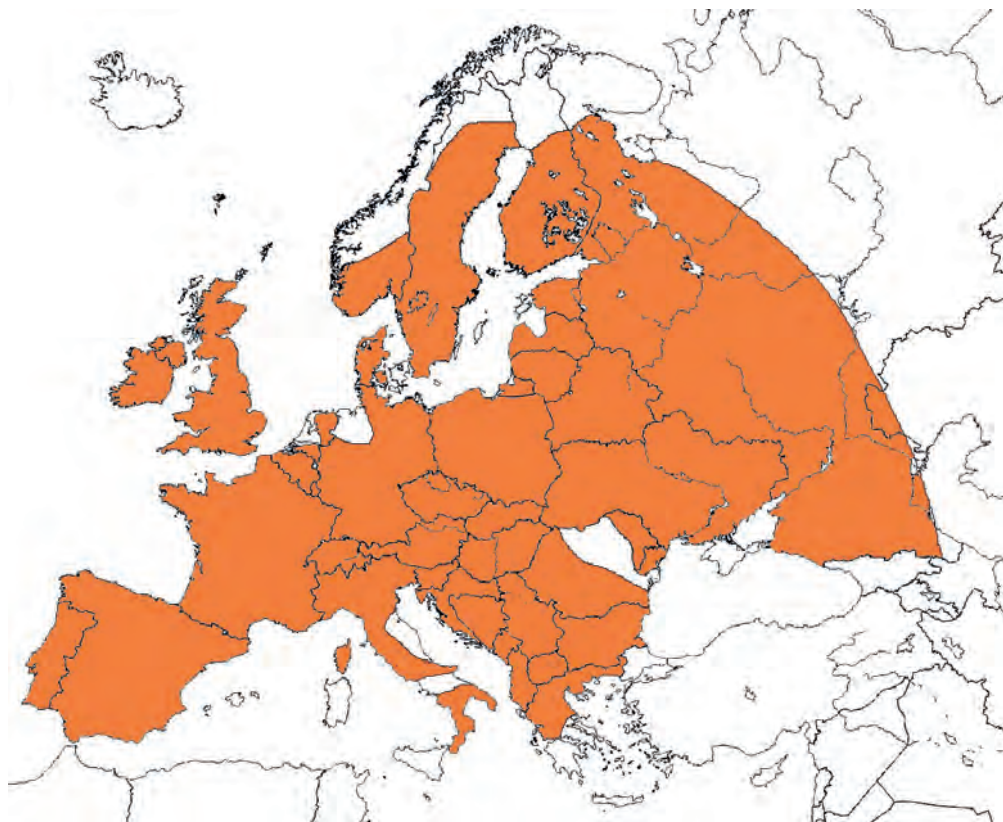


Figura 54. Distribución del tejón en Europa (en naranja).

Densidad y distribución en España

La efectividad de los programas nacionales de erradicación de TB depende parcialmente de la ecología del hospedador silvestre (Gortázar et al., 2012). Dada la creciente relevancia de los tejones en la epidemiología de la TB en España, se han realizado estimaciones de abundancia de población de tejón con el fin de establecer la base de los esquemas de control, como así aconseja el Plan de actuación español de TB en fauna silvestre (PATUBES; MAPA, 2017). Existen buenas estimaciones de la densidad de otras especies silvestres como el jabalí, pero hay poca información disponible sobre la abundancia de tejones en España. Según estudios recientes, los ambientes atlánticos soportan densidades de tejones (3,81 adultos/km²) mucho más altas que las reportadas en diferentes áreas para ambientes mediterráneos: 0,23-1,98 individuos/km² (Acevedo et al., 2014). La mayor disponibilidad de alimentos y hábitats

adecuados en las diferentes estaciones del año en la España atlántica puede explicar las diferencias en la abundancia de tejones entre estas biorregiones en España. La densidad de población estimada del tejón en ambientes atlánticos es de 1,60 grupos familiares/km². La densidad es mayor en altitudes entre los 100 y 500 metros, con 2,45 grupos familiares/km², mientras que en las áreas más bajas situadas en la costa es de 1,5 grupos familiares/km², cifra muy similar a la obtenida en zonas montañosas situadas entre los 500 a 1.500 metros de altitud con 1,17 grupos familiares/km². En las zonas de alta montaña situadas entre los 1.500-2.000 metros de altitud se ha confirmado su presencia, aunque en densidades muy bajas (0,25 grupos familiares/km²). En este sentido, se han recogido citas de la especie y fotografías mediante fototrampeo que confirman cierta utilización de algunas áreas de montaña hasta los 1.900 metros de altitud. Por grupo familiar el valor medio es de 3,46±1,51 individuos por tejonera, con lo que se obtiene una media de 5,54-8,67 individuos/km², siendo esta cifra de 8,48-13,28 individuos/km² en las zonas situadas entre los 100 y 500 metros de altitud y de 4,50-7,05 individuos/km² en el resto de las áreas. Por encima de los 1.500 metros su presencia es solo testimonial.

Movilidad

Los movimientos de tejones y los intentos de dispersión pueden facilitar la propagación y el mantenimiento de la TB en las poblaciones de tejones y también la transmisión inter-especies (Vicente et al., 2007a; Riordan et al., 2011). La mayoría de los estudios en este sentido provienen del Reino Unido y la República de Irlanda, e indican que la estructura del paisaje, las poblaciones de fauna silvestre y los usos del suelo pueden modular el comportamiento espacial del tejón y, por lo tanto, su papel en la transmisión y en el mantenimiento de la TB. De hecho, el movimiento de las áreas de actividad del tejón en estas regiones se ha relacionado con un aumento en la incidencia de TB en el ganado bovino (Donnelly et al., 2005; Vial y Donnelly, 2012).

Existe poca información en general sobre las distancias y recorridos de los tejones, principalmente debido a que tienen un comportamiento muy reservado con hábitos nocturnos. Estudios llevados a cabo en Irlanda en base a la captura y recaptura y utilizando collares GPS (Byrne et al., 2014), estiman que el 95% de los tejones se mueven en distancias medias diarias de 2,6 km, encontrando un individuo que llegó a recorrer hasta 21 km. Los individuos de dispersión a larga distancia en ese caso fueron más frecuentes de lo esperado, lo que supondría un mayor riesgo de transmisión de TB (Byrne et al., 2014). En ambientes atlánticos en España ha sido relevante el movimiento de un macho que llegó a recorrer 18 km (Figura 55). Excluyendo a este individuo el rango de movilidad medio de los tejones radiomarcados es de 128,26 ha con una

distancia media recorrida en un día de 1,2 km y una dispersión máxima de 2 km respecto a las tejoneras (Acevedo et al., 2019).

El tejón como hospedador de tuberculosis

El tejón tiene un papel muy importante en el mantenimiento de la TB producida por *M. bovis* en las islas británicas (O'Connor et al. 2012). En determinadas zonas del Reino Unido, el riesgo estimado de TB en ganado bovino ha sido asociado con el aumento de la densidad de tejones, aunque diferentes estudios arrojan resultados controvertidos. Existen diversos estudios que describen las posibilidades de transmisión de la TB de los tejones al ganado, destacando que los sacrificios masivos ("culling") de tejones disminuyeron las tasas de incidencia de la enfermedad en los bovinos de la zona (Eves, 1999). Sin embargo, leves reducciones poblacionales de tejones provocaron un aumento en la incidencia de TB en el ganado residente de las zonas limítrofes, debido a la dispersión poblacional de los tejones provocada a consecuencia de las actuaciones de control de la densidad de tejones en un área específica (Donnelly et al., 2005).

En España, el primer caso de TB bovina en tejón fue identificado en 2008 en el Parque Nacional de Cabañeros (Sobрино et al., 2008). En 2012, se llevó a cabo un estudio de seroprevalencia de TB en el Parque Nacional de Doñana, estimándose para la población de tejón un valor de prevalencia del 7,2% (Martín-Atance et al., 2006). Entre 2008 y 2012, en Asturias, se llevó a cabo un estudio sobre las relaciones epidemiológicas entre el ganado infectado de TB y las poblaciones de tejones vecinas, detectando una prevalencia en tejón mediante cultivo del 8,2% y aislando en esta especie 6 espoligotipos diferentes, comunes entre las poblaciones de tejones, jabalí y ganado bovino infectado, por lo que se concluyó que se estaba produciendo la transmisión interespecífica de la enfermedad, posiblemente a partir del ganado doméstico afectado (Balseiro et al., 2011, 2013; Muñoz-Mendoza et al., 2013). Estudios posteriores hasta la actualidad indican que la prevalencia de TB se ha mantenido estable o incluso ha disminuido en el tejón (Acevedo et al., 2019). Sin embargo, se ha detectado una tendencia creciente tanto en la prevalencia como en la proporción de animales con lesiones visibles entre los tejones estudiados en los alrededores de ganaderías bovinas positivas en los hot-spots o zonas calientes de mayor prevalencia de TB en el ganado bovino (Figura 55), lo que sugiere una posible y preocupante contaminación ambiental. En concreto, en este estudio se analizaron 83 tejones (29 capturados y 54 atropellados) con prevalencias que en el periodo 2012-2015 se situaron en un 5,55% (2/36) y que en el periodo 2016-2018 aumentaron hasta un 10,64% (5/47) (Acevedo et al., 2019).



Figura 55. Escenario de tuberculosis (TB) en región hot-spot (estrella en mapa) en Asturias. En esta zona se comparte el mismo espoligotipo (SB0828) de *Mycobacterium bovis* en un sistema multi-hospedador formado por ganado bovino, jabalí y tejón. Con el radiomarcaje de tejones se ha podido comprobar que un tejón llegó a recorrer 18 km (imagen izquierda donde se observan las ganaderías bovinas positivas a TB en rosa). En este hot-spot la prevalencia por cultivo y serología (ELISA P22) está en incremento, situándose en valores muy altos en 2018.

Distribución de las lesiones

En infecciones experimentales por vía respiratoria se ha demostrado que en esta especie la infección se disemina con rapidez, y que las vías de excreción son múltiples, incluyendo heces, orina, esputo y abscesos abiertos. La infección afecta levemente más a los machos, que presentan mayor incidencia, más rápida progresión de la enfermedad y más mortalidad en infecciones naturales (Graham et al., 2013). Las lesiones observadas en los tejones se distribuyen principalmente en los nódulos linfáticos submandibulares y retrofaríngeos, así como en la cavidad torácica en los nódulos linfáticos bronquiales y mediastínicos, la pleura y el pulmón (Figura 56). Fuera de la cavidad torácica y de la zona de "cabeza y cuello", el tejido más afectado es el nódulo linfático hepático (Figura 57). Por lo tanto, en el caso de esta especie, tanto la vía respiratoria como la digestiva serían igualmente importantes en la transmisión de la infección entre individuos. Las lesiones microscópicas se caracterizan por la presencia de granulomas en los que se observan gran cantidad de macrófagos, indicativo del predominio de la respuesta inmune innata fagocítica, junto a focos de necrosis y presencia de abundantes bacilos ácido-alcohol resistentes (Figura 57).

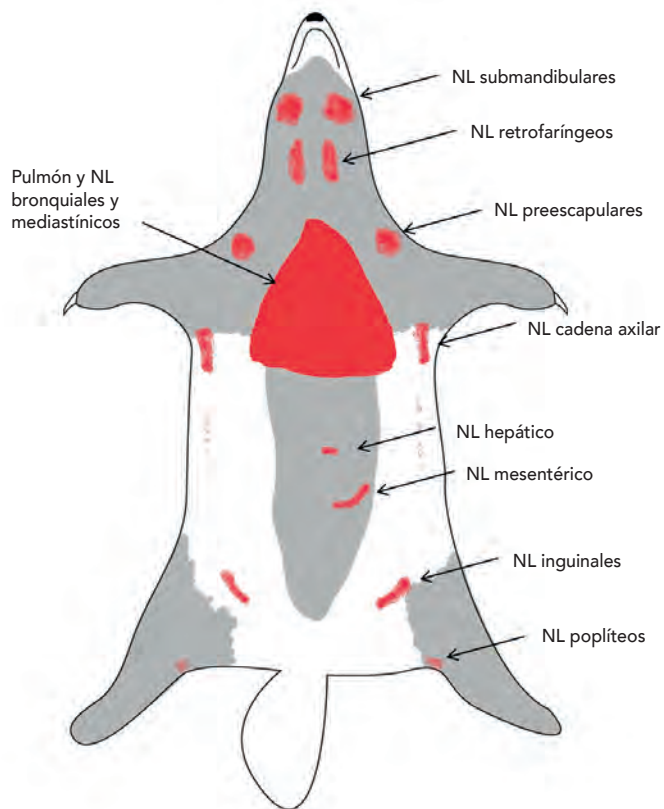


Figura 56. Localización más frecuente de las lesiones de tuberculosis en tejón. Vista ventral. NL: nódulo linfático.

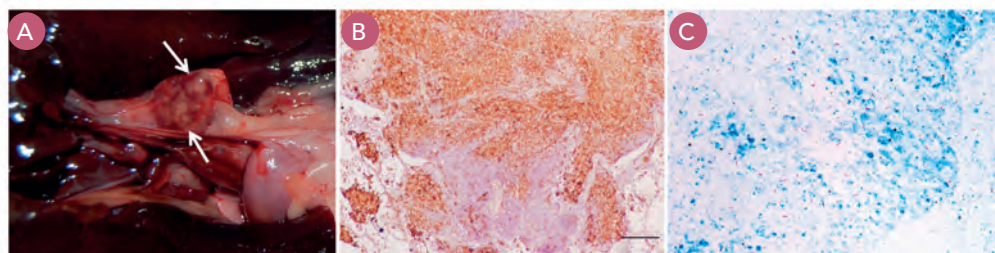


Figura 57. Lesiones macroscópicas y microscópicas de tuberculosis en tejón. A) Lesiones (flechas) en nódulo linfático hepático. B) Predominio de macrófagos (en marrón) utilizando la técnica inmunohistoquímica en granuloma tuberculoso. Técnica ABC complejo. Barra=50 micras. C) Presencia de numerosos bacilos ácido-alcohol resistentes en granuloma tuberculoso. Tinción Zielh-Neelsen. 200x.

Diagnóstico y control

El diagnóstico en esta especie incluye las mismas técnicas utilizadas para otras especies, es decir, las patológicas (ver apartado de distribución de lesiones), las bacteriológicas y las moleculares (ver capítulos 4.2.6. y 4.2.7.). En cuanto a las técnicas inmunológicas, a partir de muestras de sangre completa o suero, encontramos técnicas basadas en la detección de la respuesta inmune humoral como la técnica rápida Brock-Stat Pak (Greenwald et al., 2003) o, técnicas ELISA como la basada en la multiproteína P22 (Infantes-Lorenzo et al., 2019a). También son muy sensibles las técnicas basadas en la detección de la respuesta inmune celular desarrolladas específicamente para esta especie, como el IFN- γ (Dalley et al., 2008) o el ELISPOT (Lesellier et al., 2006).

El control en esta especie viene dado por el papel que tenga el tejón en cada situación epidemiológica concreta. En Inglaterra, donde el tejón es reservorio de TB, se ha optado por el "culling" o sacrificios masivos con resultados variables y no siempre positivos (Donnelly et al., 2005). Actualmente se trabaja en la bioseguridad y en la vacunación. En el caso de Inglaterra está permitido desde 2010 vacunar por vía parenteral a los tejones con la vacuna viva atenuada BCG. Sin embargo, no está permitido su uso en cebos vía oral administrados en el campo por tratarse de una vacuna viva. Estudios recientes indican que la vacuna inactivada por calor de *M. bovis* tiene efectos protectores en esta especie administrada directamente en las tonsilas de tejones (Balseiro et al., 2020a), por lo que su uso en cebos en campo podría ser prometedor.

4.4. Investigación para el control de la tuberculosis

4.4.1. Los programas de bioseguridad en explotaciones ganaderas para evitar el contacto con reservorios silvestres

Joaquín Vicente, Ana Balseiro, Alberto Allepuz, Saúl Jiménez-Ruiz

Conceptos de bioseguridad e interfaz

La bioseguridad se puede definir como un conjunto de medidas físicas y de manejo diseñadas para reducir el riesgo de introducción, establecimiento y propagación de enfermedades en la población animal y es, por lo tanto, una parte fundamental de los programas de prevención y control de enfermedades. De modo general, la bioseguridad se fundamenta en evitar la transmisión de agentes patógenos, limitando el contacto entre los animales infectados o los materiales infecciosos y los animales susceptibles, así como en reducir la presión de infección dentro de una población. La selección de las medidas aplicables frente a un patógeno deriva directamente del conocimiento de la epidemiología de dicho patógeno; principalmente de las vías y modos de transmisión, de la contagiosidad de los animales infectados y de la estabilidad del agente en el medio ambiente (FAO, 2010).

En este capítulo abordamos la bioseguridad específicamente en relación con la transmisión de la TB animal en la interfaz doméstico-silvestre. El concepto de esta "interfaz" existe desde que los animales domésticos son parte integral del paisaje (Bengis et al., 2002) y se refiere a las zonas de contacto potencial entre estas especies y la fauna silvestre; no siendo necesariamente un contacto directo entre animales, sino, con mayor frecuencia, un contacto de tipo indirecto, que en gran medida está modulado por factores humanos. La interfaz se manifiesta específicamente en diferentes situaciones, por ejemplo, desde los contactos de aves migratorias con granjas avícolas, hasta los producidos entre los grandes herbívoros y las especies ganaderas que comparten territorio en la sabana africana. En cada sistema, la interfaz tiene unas características diferentes y unos elementos diferenciados. En la Península Ibérica, los entornos mediterráneos configuran una interfaz muy apropiada para la transmisión del MTBC, motivada en gran parte por la elevada resistencia de las micobacterias en el medio ambiente. Además de ello, la interfaz existente en otras regiones del país, como la zona atlántica, también presenta características que pueden facilitar la transmisión. Las particularidades de éstas se describen más adelante.

En la interfaz doméstico-silvestre, a menudo compleja, se deben adoptar una serie de medidas preventivas a fin de controlar la circulación de patógenos, evitando para ello, en lo posible, la interacción entre el ganado doméstico y la fauna

silvestre. En los siguientes apartados de esta sección abordaremos el tipo de actuaciones que se han aplicado en nuestro entorno (tanto en el área mediterránea como en la atlántica), y en otros países con problemática similar, para reducir el riesgo de transmisión de TB desde las especies silvestres. Además, veremos como todas estas medidas prácticas han de integrarse en un programa de bioseguridad (aplicado en este caso a la TB) completo y específico para cada situación.

Conociendo la interacción entre el ganado y la fauna

La gestión de la fauna silvestre es esencial para reducir el riesgo de contagio en la interfaz doméstico-silvestre, especialmente en situaciones de elevada abundancia o cuando existen numerosos puntos de alta atracción para estas especies. Para llevar a cabo esta gestión es fundamental conocer la ecología y los patrones de uso de las zonas ganaderas por parte de estas especies (Barasona et al., 2014b, 2016; Acevedo et al. 2019; Triguero-Ocaña et al., 2019). Esta información es esencial para el posterior diseño de medidas prácticas y efectivas que prevengan los contactos en la interfaz (Barasona et al., 2013, 2014b; Kukielka et al., 2013; Carrasco-García et al., 2016). Aunque un estudio reciente ha evidenciado una mayor presencia de tejón en los pastos aprovechados por ganaderías bovinas positivas a TB en Asturias (Acevedo et al., 2019), aún existen grandes lagunas de conocimiento sobre estos aspectos, particularmente en algunos sistemas, como en otras regiones atlánticas del norte de España, o en algunas tipologías de ganado, como el porcino extensivo; y sobre cómo gestionar la interacción en la interfaz.

En la literatura internacional, los primeros estudios detallados fueron motivados por la transmisión de patógenos en la interfaz en sistemas ajenos a la Península Ibérica. Entre ellos, destaca el caso del ciervo cola blanca (*O. virginianus*) en Estados Unidos, el tejón europeo en Reino Unido, la zarigüeya (*Trichosurus vulpecula*) en Nueva Zelanda, o el búfalo (*Syncerus caffer*) en África (Garnett et al., 2003; Hill et al., 2005; Cooper et al., 2010). Es remarcable el hecho de que la mayoría de estos trabajos, pioneros en la caracterización de la interfaz, surgieron con relación a la TB, si bien las medidas preventivas propuestas en estos estudios son de innegable aplicación al control de otros agentes infecciosos. En dichos estudios se ha empleado una elevada variedad de métodos (fototrampeo, telemetría, conteos y encuestas, entre otros) y algunos de los resultados obtenidos evidenciaron la importancia de las interacciones indirectas a través del uso compartido de pastos y puntos de alimentación (Palmer et al., 2004). Más recientemente, estudios llevados a cabo en España han evidenciado el uso compartido de los recursos ganaderos por la fauna silvestre en diferentes escenarios epidemiológicos del centro y sur (Kukielka et al., 2013; Barasona et al., 2014b; Cowie et al., 2014a; Carrasco-García et al., 2016) y del norte del país (Balseiro et al., 2019a). En

estos casos la interacción es principalmente indirecta, produciéndose alrededor de los puntos de agua o de una forma mas dispersa en los pastos (Figura 58). Los puntos de alimentación suplementaria parecen tener una relevancia secundaria en términos generales (Kukielka et al., 2013; Carrasco-García et al., 2016), si bien, también son usados por los ungulados silvestres y su manejo ha de ser incluido en todo programa de bioseguridad frente a la fauna silvestre.

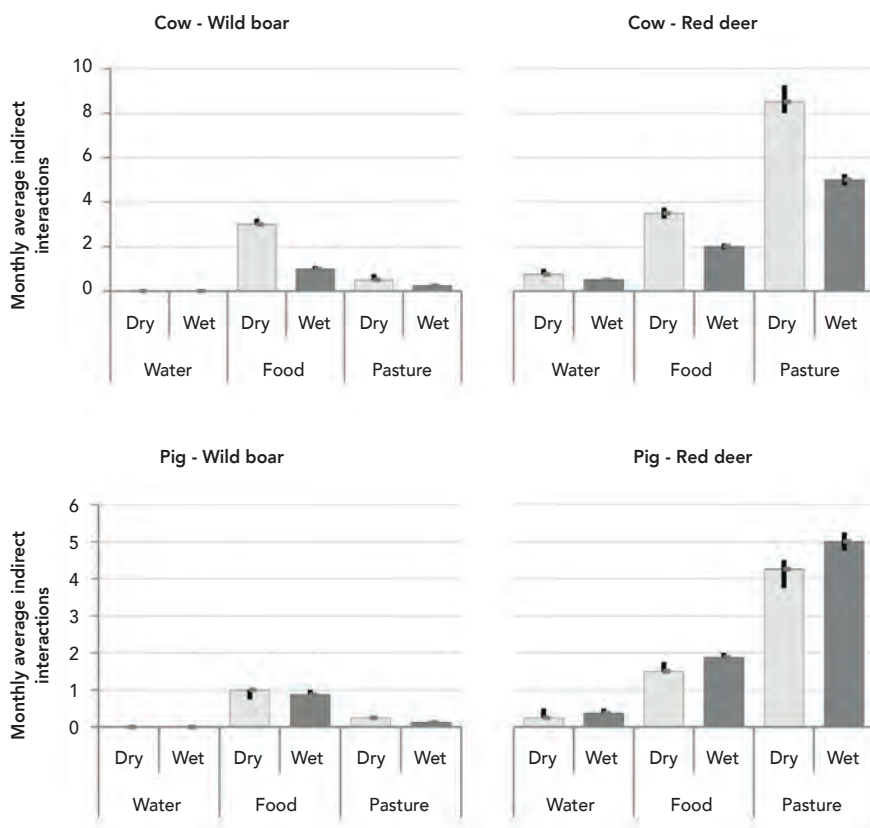


Figura 58. Cuantificación del número de interacciones indirectas de la fauna silvestre (jabalí y ciervo) seguida del ganado (bovino y porcino) en ganaderías extensivas del centro y sur de España. Calculado mediante por fototrampeo en diferentes épocas del año. Tomado de Kukielka et al. (2013).

La abundancia y distribución de la fauna silvestre en áreas de ganadería extensiva determina en gran medida la dinámica de las interacciones que pueden ocurrir en la interfaz. Por tanto, todas las medidas que podamos aplicar para reducir los contactos, como las de tipo físico (vallados), han de ser implementadas complementariamente con un adecuado control poblacional de la fauna silvestre.

Por ejemplo, estudiando el uso compartido de los recursos ganaderos por parte de ungulados silvestres (jabalí y ciervo) en el centro y sur de España, Carrasco-García et al. (2016), evidenciaron que la aplicación de un control sobre las poblaciones locales de ciervo (creando una situación de densidad baja de la especie) conllevaba una menor presencia en el entorno de las ganaderías extensivas (áreas ganaderas próximas a zonas de monte, Figura 59). Por tanto, medidas como el vallado perimetral se verían potenciadas con un adecuado control poblacional para reducir la presencia de la especie en las ganaderías.

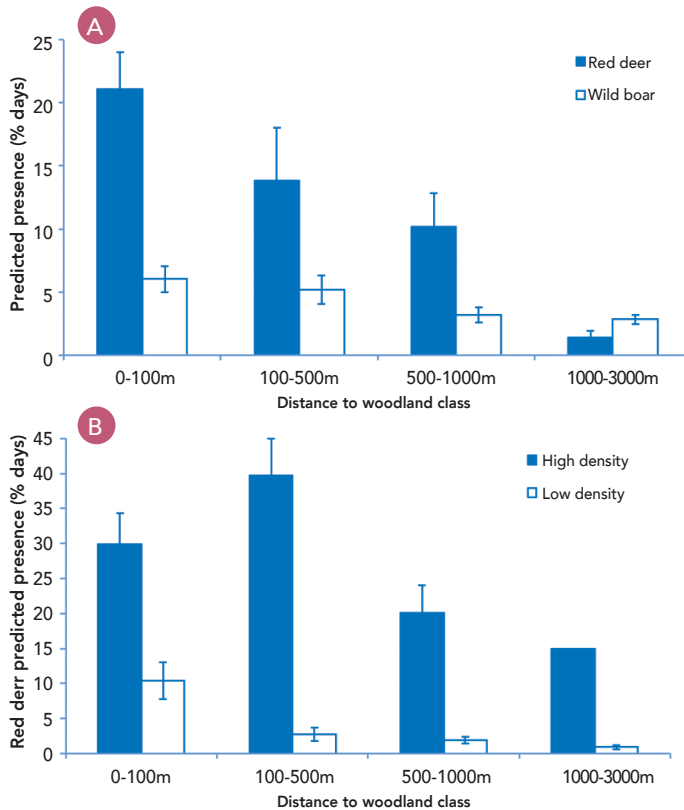


Figura 59. Estudios de presencia de ungulados silvestres.

A) Porcentaje de días (\pm SE) con presencia de ungulados silvestres (ciervo y jabalí) en función de la distancia al bosque/matorral en ganaderías extensivas del centro y sur de España, determinada mediante fototrampeo en puntos de riesgo de interacción. B) Relación entre la presencia de ciervo y la distancia al bosque/matorral según su abundancia local (alta o baja según la bolsa de caza anual). Se observa que, en una situación de baja densidad, un control efectivo de una franja menor de 100 metros en los bordes de la ganadería con el medio forestal eliminaría la práctica totalidad de posibles contactos del ganado con el ciervo. Tomado de Carrasco-García et al. (2016).

Una vez producidos los contactos entre las diferentes especies, el estado sanitario de todas ellas es un aspecto de gran repercusión sobre el riesgo de transmisión de patógenos compartidos en la interfaz (principalmente desde la fauna silvestre al ganado y en algunos casos bidireccionalmente). A su vez, existen numerosos factores que afectan a este estado sanitario y que determinan el mantenimiento y la circulación de patógenos en la fauna, y su posterior diseminación al ganado o viceversa. Todos estos factores de riesgo, que principalmente se presentan en la "parte" silvestre no controlada sanitariamente, deben ser abordados para reducir los riesgos de transmisión en la interfaz. Podemos mencionar como los factores más relevantes, y seguramente más estudiados:

- La alimentación suplementaria: influye directamente en varios de los factores que a continuación se mencionan (como por ejemplo, las elevadas densidades), por lo que la mejora de esta práctica es la principal opción a considerar.
- Las elevadas densidades.
- La elevada agregación: causada por las elevadas densidades o por la presencia de puntos de atracción artificiales (comederos o bebederos) o naturales (puntos de agua o pastos).
- La presencia de comunidades de hospedadores complejas en las que varias especies silvestres o domésticas participan (Barasona et al., 2019). A modo de ejemplo, la riqueza de especies de ungulados en el centro y sur de España se correlaciona positivamente con una mayor competencia de la comunidad de hospedadores para mantener y transmitir la TB.
- La elevada generación de subproductos de caza con potencial infeccioso: durante la temporada cinegética se produce una gran cantidad de residuos en un corto periodo de tiempo, que, debido a un manejo poco bioseguro (no siempre se retiran o eliminan), puede llegar a contactar o a ser consumida por los reservorios silvestres de la TB (Vicente et al., 2011; Carrasco-García et al., 2018).

Profundizando en este último punto, un estudio observacional reciente en el centro y sur de España evaluó una combinación de diferentes medidas de gestión de los residuos de caza (Cano-Terriza et al., 2018b). En esta área, la intensificación del manejo de los ungulados silvestres de interés cinegético ha ocasionado un aumento en sus poblaciones y, por consiguiente, una mayor generación de residuos de caza que, a su vez, puede favorecer la transmisión de enfermedades infecciosas, incluida la TB. En este estudio se evaluó la utilidad de la eliminación de los residuos de caza como medida de control de la TB en jabalí, comparando dos regiones adyacentes donde la legislación en materia de gestión de subproductos cinegéticos variaba. En la región donde la normativa se aplicó, la seroprevalencia del MTBC detectada en jabalí se redujo hasta en un 25% tras la implementación de dichas

medidas. Por el contrario, no se encontraron diferencias significativas entre periodos en los jabalíes del área control. La Figura 60 ilustra el riesgo de propagación de enfermedades infecciosas o, por el contrario, el control de enfermedades asociado a la gestión de restos de caza mayor. Hay que tener en cuenta que este es un escenario simplificado, ya que la diversidad de patógenos, contextos epidemiológicos, rutas de transmisión y formas de eliminación de residuos hace que cada caso sea singular. Cuando los cadáveres de ungulados o los residuos de la caza están disponibles, los carroñeros facultativos, como puede ser el jabalí, son más susceptibles al patógeno (como al MTBC) presente en el material que consumen.

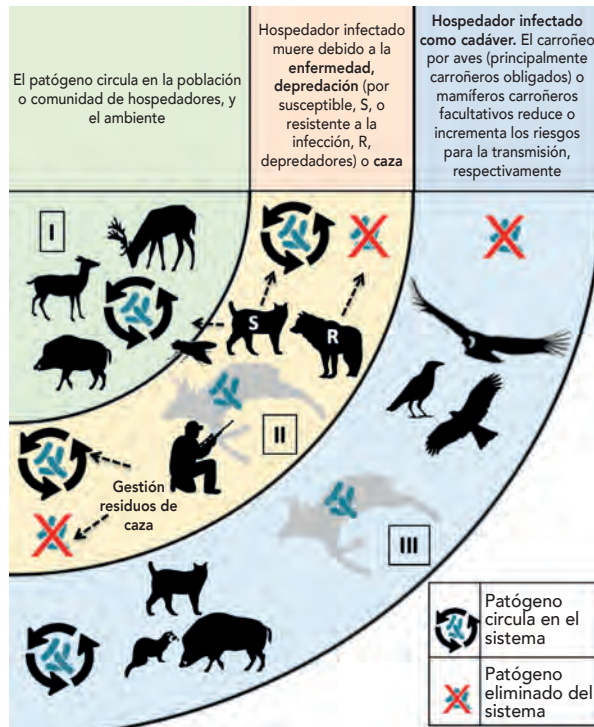


Figura 60. Escenario simplificado sobre el riesgo de propagación de enfermedades infecciosas, como la tuberculosis, o, por el contrario, prevención de la propagación de enfermedades mediante la eliminación de carroña de mamíferos.

En este ejemplo, (I) el complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC) circula en la población o comunidad de hospedadores, y el ambiente. (II) El hospedador infectado muere debido a la enfermedad, depredación (por un depredador susceptible, S, o resistente a la infección, R,) o debido a la caza/control poblacional. Se ilustra cómo el MTBC es eliminado de la circulación (mala gestión de residuos, ingesta por depredador susceptible), o bien, sigue circulando. En caso de muerte natural del hospedador infectado (III), se convierte en una carroña cuyo aprovechamiento por aves (principalmente carroñeros obligados) o mamíferos carroñeros facultativos reduce o incrementa, respectivamente, los riesgos para la transmisión. Tomado de Vicente y VerCauteren (2019).

Podemos concluir que es necesario monitorizar tanto el estado sanitario como el poblacional de la fauna silvestre, lo cual implica desarrollar y aplicar protocolos de muestreo y cálculo de abundancia apropiados y válidos (www.enetwild.com). Gran parte de las causas que provocan los riesgos sanitarios en la interfaz se derivan de situaciones de “sobreabundancia” de la fauna silvestre, la cual emerge causando disfunciones en el ecosistema, como una mayor diseminación de los patógenos. De una forma positiva, la gestión cinegética es capaz de controlar las poblaciones cuando los depredadores están ausentes, regulando las poblaciones, eliminando ejemplares enfermos, reduciendo la diseminación y mantenimiento de enfermedades y, en definitiva, impidiendo los efectos sobre el medio biótico y abiótico. Sin embargo, una excesiva abundancia poblacional, fruto de una falta de control poblacional o de una gestión intensiva, afecta de forma negativa a la conservación de medio y a las propias poblaciones cinegéticas, como se ha evidenciado en numerosas zonas del centro y sur de España en las últimas décadas.

Medidas de bioseguridad para reducir los contactos en la interfaz doméstico-silvestre

Una aproximación integral para controlar los riesgos de transmisión de patógenos en la interfaz doméstico-silvestre requiere mitigar las tasas de contacto que, como hemos visto, son principalmente indirectas. Hemos de ser conscientes que esto conlleva adaptar las estrategias de manejo tanto del ganado como de la fauna silvestre (Hutchings y Harris, 1997; Judge, 2011). Las medidas más frecuentemente adoptadas consisten en mejorar la bioseguridad utilizando barreras físicas no letales, eficaces a largo plazo, en aquellos puntos espacialmente limitados que suponen un elevado riesgo de interacción (Seward, 2007; Judge, 2011; Barasona et al., 2013; Balseiro et al., 2019a). No obstante, merece la pena recordar el dicho “es imposible poner puertas al campo”. Es decir, este tipo de actuaciones suelen ser más o menos locales y difícilmente abarcan las dimensiones requeridas, sobre todo cuando el riesgo está ampliamente distribuido y disperso espacialmente (por ejemplo, en un arroyo temporal). Además, muchas de estas barreras físicas no son completamente impermeables, sobre todo si se utilizan frente al jabalí, una especie con elevada capacidad para atravesarlas. A nivel internacional, diferentes estudios han examinado la eficacia de una gran variedad de barreras de tipo físicas y biológicas en diferentes escenarios epidemiológicos (algunas barreras finalmente se convierten en psicológicas, como las vallas electrificadas), evaluando su potencial aplicación en la exclusión o contención de los ungulados silvestres:

- Dispositivos para ahuyentar a la fauna (Seward, 2007).
- Luces láser (VerCauteren et al., 2006a).

- Explosores de gas propano (Gilsdorf et al., 2004).
- Perros protectores del ganado (VerCauteren et al., 2008; Gehring et al., 2011).
- Puertas de seguridad utilizadas selectivamente por humanos (VerCauteren et al., 2010) o por el ganado (Barasona et al., 2019).
- Recintos electrificados (Karhu y Anderson, 2006) y diferentes cercas (VerCauteren et al., 2006b; Fischer et al., 2011; Phillips et al., 2012; Barasona et al., 2013).
- Comederos y bebederos selectivos (Barasona et al., 2013, Balseiro et al., 2019a).

En general, se ha evidenciado una eficacia variable de estas medidas para disuadir a los ungulados silvestres de los recursos ganaderos en cada contexto en que se manifiesta la interfaz doméstico-silvestre. Aprovechando que el ganado tiene menor capacidad para atravesar vallados que los ungulados silvestres (Berentsen et al., 2014), se ha probado con éxito, por ejemplo, un vallado experimental diseñado para excluir al ciervo rojo norteamericano sin impedir el paso de otras especies silvestres, incluidos los ungulados más pequeños (VerCauteren et al., 2007). La estrategia más interesante incluye la combinación de diversas barreras, entre otro tipo de medidas, para segregar el uso del espacio y de los recursos entre la fauna y el ganado. En la Figura 61 se ejemplifica esta aproximación en un estudio realizado en el valle de Alcudia, una zona con elevada carga ganadera, densidad de ungulados silvestres e incidencia de TB en ambos grupos (Barasona et al., 2013). En la Figura 62 se muestra la eficacia de estas barreras utilizando la TB como indicador. La Figura 63, por su parte, muestra una aproximación similar realizada en Caravia (Asturias), en una zona con elevada densidad de jabalí.



Figura 61. Actuaciones para hacer los puntos de interacción “permeables solo al bovino” o “permeables solo a los ungulados silvestres”.

A) Valla a prueba de ungulados en abrevadero tipo charca. B) Valla a prueba de bovino, apto para ciervos (saltando) y con pasos para ovino. C) Puerta a prueba de fauna silvestre. D) Paso a nivel del suelo adecuado para el jabalí. E) Cepillo en puerta a prueba de fauna silvestre activado mediante el empuje del bovino sobre el brazo armado que soporta este un cepillo a modo de rascadero. F) Apertura selectiva para corzo (y potencialmente rayones) en una valla a prueba de ganado bovino. Tomado de Barasona et al. (2013).

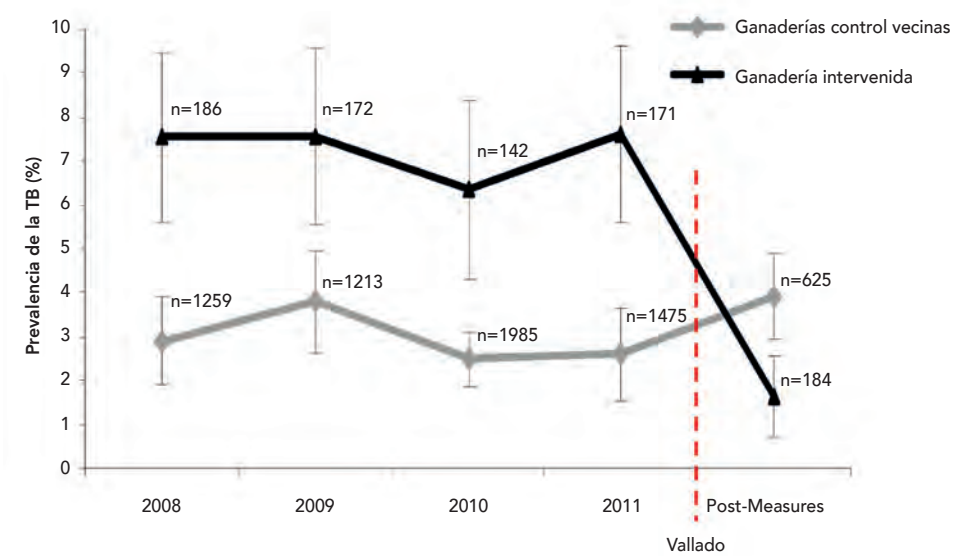


Figura 62. Estudio sobre la incidencia de tuberculosis (TB) en ganaderías bovinas tras el uso o no de medidas de bioseguridad. Tendencia decreciente en la incidencia de la TB (%) en ganado bovino (línea negra), tras la implementación de las barreras selectivas en los puntos de agua. En las fincas vecinas donde no se actuó (línea gris), la incidencia de la TB se mantuvo en los mismos niveles o incluso se observó un cierto repunte. Tomado de Barasona et al. (2013).



Figura 63. Tolva de alimentación selectiva para terneros con el fin de impedir el acceso a los jabalíes. A) Tolva vieja donde los terneros comían diariamente (recuadro). B) Jabalíes alimentándose por la noche, accediendo incluso al interior del viejo comedero. C) Diseño de una tolva selectiva con barras móviles que solo se pueden desplazar por los terneros. D) Terneros alimentándose en la nueva tolva. E-F) Los jabalíes no puede acceder al pienso en la nueva tolva y permanecen a su alrededor. Tomado de Balseiro et al. (2019a).

Las barreras, al igual que otras medidas preventivas de manejo no establecidas mediante barreras, deben ser específicamente diseñadas tras evaluar la configuración y el riesgo de cada punto de interacción, e integrarse en un programa global de bioseguridad, como veremos en el siguiente apartado.

Los programas de bioseguridad frente a la tuberculosis de la fauna silvestre aplicados a las explotaciones ganaderas extensivas

Los programas de bioseguridad frente a la TB de la fauna silvestre en explotaciones ganaderas extensivas son medidas adicionales al Programa nacional de erradicación, que deben ser introducidas paulatinamente para gestionar los riesgos de interacción identificados en la interfaz doméstico-silvestre. Estos programas de bioseguridad son esenciales en situaciones como la de la ganadería extensiva del centro y sur de España, donde la vía de entrada de la infección en los rebaños es frecuente que se origine a partir de las especies silvestres. Por ello, es fundamental adoptar una visión integral del Programa y, además de cumplir con las obligaciones de éste, el ganadero debe guiarse por las recomendaciones de los veterinarios de las asociaciones de defensa sanitaria ganadera (ADSG) y los servicios veterinarios oficiales en materia de bioseguridad. Sin embargo, actualmente no existen protocolos armonizados y estandarizados, ni personal con formación para llevarlos a cabo de forma específica, abordando el diagnóstico de cada situación y seleccionando las medidas a adoptar en cada ganadería.

En granjas bovinas del Reino Unido, el uso de medidas simples de exclusión aplicadas de forma adecuada fue eficaz al 100% para prevenir la entrada de tejonas a las naves. Estas medidas también redujeron el número de incursiones de tejonas al resto de la granja, contribuyendo potencialmente a reducir la transmisión de la TB entre tejonas y el ganado bovino (Judge, 2011). En el Parque Nacional de Riding Mountain (Canadá) el vallado a nivel local se combinó exitosamente con el uso de perros pastores (junto con estrategias de diagnóstico-eliminación y prohibición de alimentación suplementaria) para reducir el riesgo de transmisión de MTBC desde los cérvidos al ganado (O'Brien et al., 2011a). En nuestro país, como ya se ha comentado, existen antecedentes prometedores en este sentido, obteniéndose una reducción significativa en la incidencia de TB en ganado bovino (Figuras 61 y 62).

A pesar de estas experiencias, la disponibilidad de protocolos que permitan trabajar de forma sistemática y respaldada científicamente brilla por su escasez. En esta línea, hay que destacar las actividades desarrolladas por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (U.S. Department of Agriculture) en Michigan, pues, aunque existen otras experiencias en Reino Unido, Irlanda, Nueva Zelanda y Canadá, Michigan es el único ejemplo donde se ha llevado a cabo un plan de mitigación del riesgo de forma oficial y a gran escala (Walter et al., 2013).

Durante los últimos años en nuestro país se está trabajando en el desarrollo de protocolos de evaluación del riesgo de interacción, transmisión de la TB en la interfaz doméstico-silvestre y posterior preparación de programas de bioseguridad específicos, utilizando un número y diversidad de explotaciones lo suficientemente representativo como para evaluar los diferentes aspectos prácticos en cada ganadería extensiva. Este trabajo, centrado principalmente en bovino, ha evidenciado que debido a las particularidades de cada situación, hay que evaluar específicamente en cada explotación qué medidas pueden ser lo suficientemente selectivas y efectivas para segregar las especies domésticas y silvestres a nivel espacial. Un programa de bioseguridad específico de explotación ha de ser:

- Efectivo: debe minimizar los contactos directos e indirectos.
- Práctico: ha de ser realizable por el ganadero.
- Realista: no se pueden eliminar los riesgos de interacción al 100%, el objetivo es reducirlos al máximo. Además, como se ha mencionado, un programa de bioseguridad frente a la fauna silvestre ha de integrarse con las medidas que contempla el Programa nacional de erradicación de la TB, para que el conjunto de medidas obtenga los mejores resultados posibles.

El desarrollo ideal de un programa de mitigación del riesgo en explotaciones extensivas debería constar de los siguientes pasos o tareas de forma progresiva:

1. Reunión con los servicios veterinarios oficiales, identificación de la explotación, evaluación de sus antecedentes sanitarios, preparación de documentación y cartografía.
2. Reunión informativa con el ganadero, encuesta epidemiológica y auditoría de bioseguridad (si procede, con toma de muestras ambientales).
3. Propuesta de plan de mitigación del riesgo y compromiso por parte del ganadero.
4. Implementación del plan.
5. Verificación de la correcta implementación del plan.
6. Valoración de resultados sanitarios (evolución de la incidencia de la TB en el ganado, la fauna y el medio ambiente) y relación de costes/beneficios.

Respecto a la caracterización de variables de hábitat, manejo de las explotaciones ganaderas y riesgos de interacción (punto 2), las variables se han de elegir en base a su potencial papel en la epidemiología de la TB, así como en base a las características locales de manejo de ganado y de ungulados silvestres. Esta caracterización se debe realizar encuestando personalmente a cada ganadero o gestor de fincas: para cada explotación se obtienen datos generales relacionados

con los usos y manejos del territorio, con los sistemas de alimentación y abrevaderos utilizados para el ganado, así como con la gestión llevada a cabo para los ungulados silvestres, identificando las potenciales zonas y puntos de contacto entre ambos colectivos (cultivos, abrevaderos, puntos de alimentación, pastos, zonas de montanera...). Todos estos puntos se georreferencian *in situ* utilizando dispositivos GPS y se plasman posteriormente sobre el material cartográfico, donde adicionalmente se incluye información epidemiológica de las explotaciones, cotos de caza y espacios naturales colindantes. La Tabla 12 incluye las principales variables procedentes de la caracterización de las explotaciones tras la entrevista y visita de reconocimiento.

Tabla 12. Variables para considerar en la caracterización del riesgo de interacción interespecífica en los programas específicos de bioseguridad frente a la tuberculosis de la fauna silvestre en las explotaciones ganaderas extensivas del centro y sur de España.

Características generales	Localización geográfica Superficie (ha) Usos del suelo en zona, incluidas las fincas limítrofes Presencia de vallados y su permeabilidad Datos de caza (bolsas anuales) en la zona y áreas circundantes Manejo general del ganado, rotación del pastoreo y temporalidad del pastoreo
Alimentación	Tipo de alimentación del ganado: almacenamiento y dispensación Uso en extensivo de los pastos y áreas de matorral y forestales Método de alimentación suplementaria en su caso Número y localización de comederos Uso común de puntos de alimentación entre ganado y animales silvestres Uso común de pastos entre ganado y animales silvestres Índice de agregación de ungulados en puntos de alimentación
Puntos de agua	Tipo de abrevaderos disponibles: naturales y artificiales Número y georreferenciación de puntos de agua Densidad de puntos de agua disponibles Índice de agregación de cada especie en puntos de agua

Las medidas generales de mitigación del riesgo por parte del ganadero deberían incluir los siguientes puntos:

- Se debe cumplir con el Programa nacional de erradicación de la TB de una forma estricta y rigurosa, ya que el principal reservorio de TB para el bovino es el propio ganado. Así pues, si no se cumple esta primera premisa, toda actuación de bioseguridad frente a la fauna silvestre quedará en segundo plano en lo referente a la reducción del riesgo frente a la TB.

- Se debe monitorizar el estado poblacional y sanitario de los reservorios silvestres de la TB e implementar un control de estas especies en ambos niveles. Asimismo, se debe monitorizar el estatus sanitario de TB en los reservorios domésticos simpátricos, como el cerdo, en caso de estar presentes en la explotación.
- Se recomienda utilizar barreras físicas no letales (vallados) para favorecer el uso selectivo del territorio y los recursos por parte del ganado y la fauna silvestre, tanto a nivel perimetral como en los cerramientos internos.
- Se recomienda evitar que el ganado acceda a ciertas zonas de riesgo en pastos y puntos de agua, especialmente durante las épocas del año en las que la probabilidad de transmisión de enfermedades como la TB es más alta.
- Se recomienda mantener todos los puntos de agua y comederos en condiciones higiénicas e implementar herramientas que permitan un acceso selectivo al agua o alimento por parte de las diferentes especies. Las charcas han de evitarse como fuente de agua para el ganado, siendo recomendable su sustitución por bebederos selectivos.

Existen diferentes posibilidades de intervención para resolver problemas de bioseguridad específicos. Por ejemplo, planificar el uso de los pastos en el espacio y el tiempo, cambiar la forma de alimentar al ganado en el interior de la granja o incluso cambiar (o redistribuir en la ganadería en función del riesgo) las especies explotadas por otras menos susceptibles para una enfermedad concreta.

Ciertas medidas presentan como principal desventaja su elevado coste, por ejemplo, cuando se trata de superficies a delimitar mediante vallados, que son normalmente de gran tamaño y también costosas de mantener. Además, la implementación de algunas medidas, como vallados impermeables, puede chocar con la normativa ambiental vigente, especialmente en espacios naturales, lo cual crea la necesidad de la colaboración por parte de las diferentes administraciones. Sin embargo, otras medidas de exclusión como el uso de comederos selectivos han demostrado ser eficaces y, a su vez, económicamente atractivos para los ganaderos (Balseiro et al., 2019a).

En resumen, la información acumulada durante los últimos años debería permitir el desarrollo de protocolos prácticos para implementar programas de bioseguridad frente a la fauna silvestre en explotaciones ganaderas extensivas de España, así como para valorar la eficacia y los costes asociados.

4.4.2. Control sanitario en especies cinegéticas

Christian Gortázar, Ana Balseiro

El control sanitario en especies cinegéticas parte de tres bases: (1) un buen diagnóstico epidemiológico, (2) una monitorización integrada y (3) la bioseguridad de las explotaciones ganaderas. A la última le dedicamos el capítulo 4.4.1. de este libro. El diagnóstico epidemiológico consiste en definir el área de actuación e identificar, con el mayor detalle posible, cuáles son los hospedadores (domésticos y silvestres) que participan en el mantenimiento del MTBC, y cuáles son los mecanismos más probables de transmisión y mantenimiento de la infección, con especial atención a la transmisión entre especies. Este área de actuación incluiría también al medio ambiente, es decir, agua, barro, etc., que pudieran estar contaminados con MTBC. Se trata de identificar las conexiones para buscar la forma de interrumpirlas mediante intervenciones estratégicas. La monitorización integrada, por su parte, comprende el seguimiento sistemático de las poblaciones de especies cinegéticas relevantes (en relación con la TB, jabalí, ciervo y gamo), la vigilancia sanitaria pasiva y la vigilancia sanitaria activa. Solo partiendo de datos fiables y continuados sobre abundancias, prevalencias y contactos seremos capaces de evaluar el efecto de cualquier intervención de control sanitario (Figura 64).

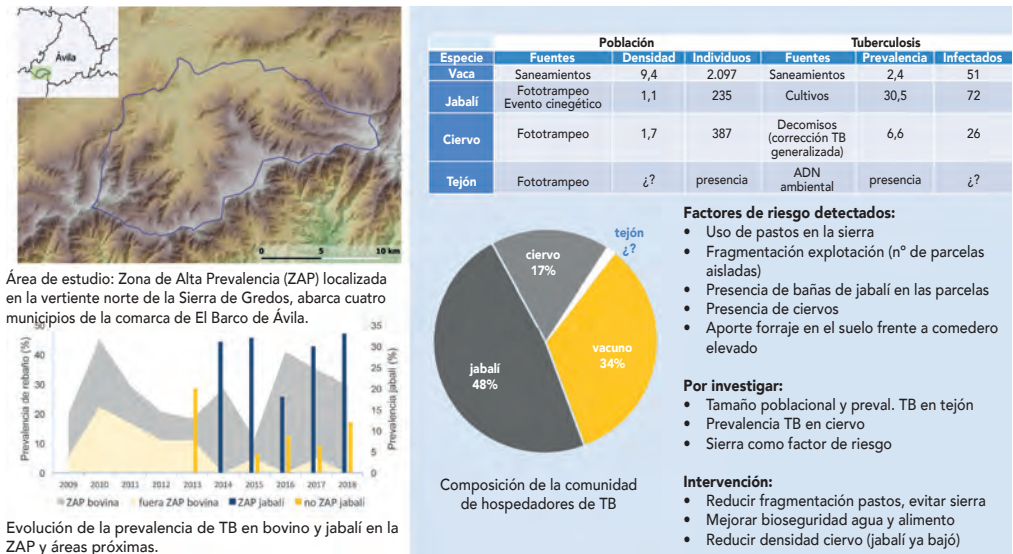


Figura 64. Ejemplo de diagnóstico epidemiológico y monitorización integrada.

En esta zona de estudio se han cuantificado los hospedadores y se ha determinado su prevalencia de tuberculosis (TB). Además, se han identificado los factores de riesgo en las explotaciones bovinas. También se han identificado los datos que faltan, como lo relativo al tejón o a la prevalencia de TB en ciervos (datos incompletos).

Fuente: trabajos realizados en colaboración Castilla y León – IREC, entre 2018 y 2020.

Las decisiones relativas a intervención dependen de la región geográfica y de su situación epidemiológica. Las herramientas de control sanitario aplicables a la TB en especies cinegéticas son relativamente pocas, y se pueden dividir en:

- Medidas preventivas y de bioseguridad.
- Control poblacional.
- Vacunación.

Además, debe considerarse siempre la posibilidad de utilizar la zonificación (definir zonas de alto riesgo, y gestionarlas de forma diferenciada) y la compartimentalización (definir sistemas de manejo, por ejemplo, vallados cinegéticos con suplementación, y gestionarlos de forma diferenciada). La idea subyacente es que, igual que las explotaciones ganaderas contribuyen al control de la TB al facilitar los saneamientos mediante instalaciones adecuadas y al implementar medidas de bioseguridad, los terrenos cinegéticos también pueden contribuir. A continuación, repasamos las principales herramientas considerando su base científica y su aplicabilidad práctica en España (Figura 65).

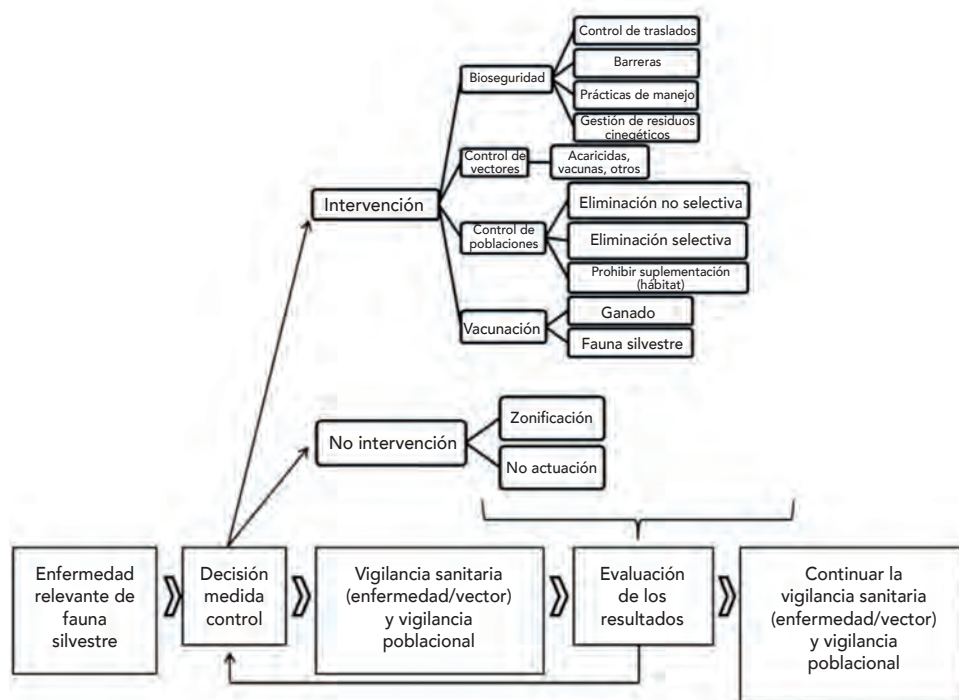


Figura 65. Principales herramientas de control sanitario en fauna silvestre.

Diagrama de flujo sobre la toma de decisiones y las opciones de intervención en sanidad de fauna silvestre. Fuente: PATUBES, modificado de Gortázar et al. (2015).

Medidas preventivas y de bioseguridad

Debido a la diversidad de espacios cinegéticos en España hemos considerado dividir esta sección en medidas aplicables a granjas de caza o territorios con alta densidad de ungulados y en medidas aplicables a territorios con baja densidad de ungulados. Excluiremos dentro de estas medidas a aquellas que se refieren a la bioseguridad en explotaciones ganaderas, incluidas en el capítulo 4.4.1. de este libro.

Medidas preventivas y de bioseguridad en granjas de caza o áreas de alta densidad de ungulados

Control sanitario en granjas de caza

La TB es uno de los principales problemas de la producción de ciervo, gamo y jabalí de granja. Las granjas de especies cinegéticas se caracterizan por una densidad muy alta, normalmente de una única especie, por una alimentación mayoritariamente suplementaria, y por la posibilidad de identificación y control sanitario individual. Las explotaciones de producción y reproducción de caza mayor registradas en el REGA incluyen 135 granjas de jabalí, 81 de ciervo, 36 de gamo y 13 de corzo (Fuente: MAPA). Además, existe un número desconocido, pero elevado, de cotos con instalaciones de captura y manejo ("zonas de cría controlada" o "cercones") que funcionan como granjas sin tener REGA.

La solución debería llegar a partir de la reciente aprobación del Real Decreto 138/2020, de 28 de enero, por el que se establece la normativa básica en materia de actuaciones sanitarias en especies cinegéticas que actúan como reservorio de la TB (MTBC). Pasa, en primer lugar, por registrar en REGA todas las granjas cinegéticas e instalaciones afines, procurando el testado anual de toda la población, seguido de la eliminación selectiva de animales positivos, de forma similar al saneamiento ganadero. Es hora de cruzar los datos entre las administraciones responsables de caza y las responsables de ganadería. A partir del inventario completo de granjas, sería factible plantear su saneamiento mediante IDTB en ciervo y gamo y mediante ELISA en jabalí. Aunque no contemplado en el Real Decreto, podría plantearse también el saneamiento utilizando las técnicas de IFN- γ y ELISA en ciervo y gamo (ver sección 4.2. y capítulo 4.3.5.).

Control sanitario en traslados

Es fundamental evitar introducir la TB en áreas todavía no infectadas. Para ello, conviene evitar la introducción de ungulados, especialmente de ciervos, gamos o jabalíes, excepto cuando provengan de fuentes con garantía sanitaria. España cuenta para ello con una herramienta pionera en Europa, el Real Decreto 1082/2009, de 3 de julio, por el que se establecen los requisitos de sanidad animal para el movimiento de animales de explotaciones cinegéticas, de núcleos zoológicos, así como

de fauna silvestre. Para facilitar en lo posible ese control, en los últimos años se han optimizado en España metodologías que permiten el diagnóstico de TB en cérvidos (Fernández-de-Mera et al., 2009) y jabalíes (Boadella et al., 2011).

Gestión de residuos de caza

Anualmente se cazan en España varios cientos de miles de piezas de caza mayor, particularmente jabalíes (unos 400.000), y sus restos suponen una fuente importante de contagio para otros jabalíes, pero también para algunas otras especies animales, principalmente carnívoros. En un estudio realizado en Andalucía y Castilla-La Mancha, donde se controlaron adecuadamente los residuos de caza en unas fincas, mientras en otras se continuaba con su gestión tradicional, se comprobó que controlar adecuadamente los residuos de caza puede reducir un 25% la presencia de TB en los jabalíes (Cano-Terriza et al., 2018b).

El mayor interés del control de residuos estriba, por tanto, en evitar que estos residuos sean consumidos por jabalíes. Que haya algún consumo por parte de carnívoros es un mal menor. Y si ese consumo se produce por parte de aves carroñeras como los buitres, en realidad se trata de algo en principio deseable desde el punto de vista sanitario (Figura 66). No obstante, hay que considerar también que la presencia de restos de plomo en los residuos puede suponer un riesgo para algunas especies de aves.



Figura 66. Buitre leonado (*Gyps fulvus*) consumiendo una carroña de jabalí. Las aves necrófagas son grandes aliadas en el control sanitario de la fauna silvestre.

Por consiguiente, las regulaciones actuales (y venideras) buscan principalmente evitar que los residuos de caza se queden en el campo, accesibles a jabalíes u otras especies. Las alternativas pueden ir desde el tratamiento de los residuos como residuos urbanos cuando se trata de caza de autoconsumo, pasando por el depósito en contenedores que serán recogidos y tratados por empresas especializadas o por el enterramiento, hasta los muladares o lugares de depósito, siempre que tanto fosas como muladares estén correctamente vallados para evitar la entrada de jabalíes y otros ungulados silvestres. Pero lograr esto es muy complicado. Principalmente, porque sacar las piezas del monte cuesta un gran esfuerzo que, en muchos casos, apenas se ve recompensado ni por el trofeo ni por el valor obtenido por la venta de la carne. Si se regula la gestión de residuos sin la necesaria flexibilidad, ocurrirá justo lo contrario: los cazadores se verán tentados a abandonar las piezas menos interesantes, o aquellas capturadas en lugares inaccesibles. Por ello, en lugares particularmente inaccesibles y ante la imposibilidad práctica de sacar del monte o enterrar la pieza o sus residuos sería deseable, al menos, colocar dichos restos en un lugar visible y accesible para las aves necrófagas, en un intento de minimizar su disponibilidad para el jabalí u otras especies.

El problema de los residuos no se soluciona solo con regulación. Si los residuos suponen una complicación más a la hora de cazar, la solución será cazar menos o esconder más dichos residuos. Es necesario informar y convencer a los cazadores de que la gestión de los residuos de caza influye sobre su salud y la de los suyos, sobre la sanidad animal y la viabilidad de las explotaciones ganaderas, y sobre el medio ambiente. Y es necesario que también la administración se implique a fondo en facilitar la gestión de residuos, por el bien de todos.

Manejo del agua y del alimento

Las mayores prevalencias de TB en ciervo y jabalí ocurren en el cuadrante suroccidental peninsular, en dos situaciones muy dispares, los espacios naturales protegidos y las fincas valladas de caza mayor. Ambas situaciones tienen en común la existencia de altas densidades de ungulados silvestres, la agregación espacial en torno a puntos de agua y comederos, y un clima mediterráneo con veranos cálidos y secos. Además, los miembros del MTBC sobreviven bien en el medio ambiente, como demuestra su alta probabilidad de detección sobre distintas matrices incluidos el alimento y el agua. Se ha comprobado que la transmisión entre especies depende principalmente de este tipo de contactos indirectos en puntos de agua o comederos, y ello ofrece oportunidades para la mejora de la bioseguridad de las explotaciones y para las buenas prácticas cinegéticas.

Los experimentos en los que se procura evitar el uso de puntos de agua (Barasona et al., 2013) o de comederos (Balseiro et al., 2019a) del ganado por parte de la fauna silvestre son bien conocidos. Sin embargo, no conocemos trabajos

experimentales en relación con el manejo del agua y del alimento en especies de caza, buscando específicamente reducir la incidencia de TB en estas especies. En relación con el agua, se sabe que la prevalencia de TB es mayor a mayor concentración de jabalíes por punto de agua (Vicente et al., 2007b), que en años de sequía (con menor disponibilidad de agua) aumenta la TB generalizada en jabalíes (Vicente et al. 2013), y que la probabilidad de encontrar ADN del MTBC es inversamente proporcional al diámetro de la charca (Barasona et al., 2017). Por consiguiente, parece razonable maximizar el número de puntos de agua, siendo preferibles los arroyos, los pequeños embalses y las charcas de gran diámetro a las charcas de poco diámetro. En cuanto al efecto de la distribución del alimento sobre la TB en especies cinegéticas, el conocimiento científico existente es muy limitado. Sin embargo, parece sensato que, cuando se aporten alimentos concentrados en vallados cinegéticos autorizados, ello se haga de manera selectiva, por especies, buscando minimizar el contacto indirecto entre cérvidos y jabalí.

Caza selectiva de individuos visiblemente debilitados

La TB es una enfermedad crónica que termina matando a los individuos que desarrollan una infección generalizada. En zonas de alta prevalencia, la TB mata un tercio de los jabalíes adultos, casi tantos como la caza (Barasona et al., 2016). En el campo es posible identificar este tipo de individuos debilitados por una TB avanzada, aunque obviamente podrían confundirse con otros procesos consuntivos. En efecto, la presencia de individuos delgados, a veces con nódulos linfáticos visiblemente aumentados de tamaño, en la proximidad de puntos de agua, es un factor de riesgo para la excreción de ADN de MTBC en esos puntos de agua (Barasona et al., 2017). En consecuencia, parece sensato facilitar la caza selectiva de individuos manifiestamente delgados o enfermos. Esta caza selectiva debe ir seguida de un diagnóstico y de la correcta eliminación de los residuos generados. En este sentido, no nos constan experiencias previas en la aplicación de caza selectiva para el control de TB en fauna silvestre.

Medidas preventivas y de bioseguridad en áreas de baja densidad de ungulados

Las menores densidades de población de ungulados silvestres, así como las menores prevalencias de TB en estas especies, ocurren principalmente en la mitad norte peninsular. Por lo general, en estos territorios la prevalencia de TB en bovino también suele ser baja. Sin embargo, encontramos áreas o unidades veterinarias locales concretas donde la prevalencia de TB en bovino es mucho más alta que en el resto del territorio. En estos lugares, la prevalencia de TB en ungulados silvestres es también alta (mayor que en el resto del territorio), compartiendo los animales infectados las mismas cepas que las que se aíslan de ganado

bovino, ovino y caprino infectado de la misma zona (Muñoz-Mendoza et al., 2013). Obviamente, debido a las características orográficas de estos territorios de baja densidad, o bien debido a la mayor dispersión de sus poblaciones, las medidas preventivas que se deben tomar deberán estar adaptadas a estas situaciones. En estos lugares, por ejemplo, la alimentación suplementaria es ocasional, apenas existen vallados y no hay concentración de animales en puntos de agua debido a la mayor disponibilidad de la misma. En este sentido, podríamos decir que es una ventaja, y no deja de serlo. Sin embargo, el diagnóstico epidemiológico de la mayor parte de los animales que componen la población, así como su posible monitorización integrada y posterior manejo (ejemplo, vacunación) se complica, al resultar mucho más difícil la obtención de un número representativo de muestras o el acceso a estos animales.

En cualquier caso, las poblaciones de ungulados silvestres crecen en España independientemente del aporte de alimentación suplementaria. La superficie cultivada ha disminuido en favor del matorral y del bosque, con un incremento del 33% de la superficie forestal nacional en los últimos 15 años. Al mismo tiempo, han cambiado tanto los tipos de cultivo, con más maíz y más leñosas, como las formas de cultivo, con más regadíos. Estos cambios, unidos a una progresiva disminución del número de cazadores, favorecen enormemente a los ungulados silvestres, incluidos el ciervo, el gamo y el jabalí, que han multiplicado exponencialmente sus poblaciones (Garrido et al., 2019). Con todo, parece lógico no aportar alimentos concentrados (granos de cereal o piensos compuestos) en terrenos cinegéticos abiertos y, en la medida de lo posible, promover la protección de cultivos a fin de lograr el doble beneficio de prevenir daños a la agricultura y reducir la capacidad de acogida del hábitat. Esta es la forma más sostenible, aunque ciertamente utópica, de gestión de las poblaciones de ungulados silvestres.

Otras medidas como la gestión correcta de residuos son aplicables también en territorios de baja densidad de ungulados, así como la caza selectiva de individuos visiblemente debilitados, en caso de haberlos. Como ejemplo, en la sierra del Sueve (Asturias) se lleva a cabo desde hace muchos años la caza selectiva de gamos caquéuticos y debilitados enfermos de PTB.

A pesar de que este capítulo se centra en especies cinegéticas no hay que olvidar otras especies no cinegéticas, pero no menos importantes, dentro del concepto "monitorización integrada". En el caso de ambientes atlánticos el tejón (ver capítulo 4.3.7.) se ha demostrado como un actor relevante en áreas de alta prevalencia de TB en el ganado bovino (Acevedo et al., 2019). Con todo ello queremos resaltar que no podemos dedicar todos los esfuerzos a una única especie, sino que debemos entender cuál es la situación epidemiológica en cada región, para así poder tomar las medidas adecuadas.

Control poblacional

Control poblacional no selectivo

Aunque la transmisión de MTBC en fauna silvestre no depende solo de la densidad, es innegable que reducir la densidad de hospedadores clave tiene efectos positivos en cuanto a la incidencia de TB en esos y en otros hospedadores, incluido el bovino (Boadella et al., 2012; García-Jiménez et al., 2013). Además de la caza, la regulación de las poblaciones por parte de un super-predador como el lobo contribuye al control de la TB tanto en el jabalí como en el ganado bovino (Tanner et al., 2019). Evidentemente, esta función ecosistémica solo tiene lugar en situaciones concretas de densidad de lobo, como ocurre en las reservas de caza de Asturias. En otras situaciones, son los cazadores quienes aportan ese servicio a la sociedad (Quirós-Fernández et al., 2017).

Por consiguiente, un aspecto fundamental de las buenas prácticas cinegéticas consiste en mantener poblaciones animales equilibradas, evitando situaciones de sobreabundancia. Para identificar tales situaciones deben realizarse censos y monitorizar la condición física y el estado sanitario de las piezas abatidas. En vallados o espacios naturales protegidos con alta densidad, se recomienda además la colocación de pequeños cercados de exclusión frente a herbívoros (<1000m²) como puntos control para evidenciar su impacto sobre el medio. En poblaciones sobreabundantes de especies cinegéticas, y en casos donde la prohibición de alimentación suplementaria y manejo sostenible del hábitat no pueden aplicarse o resultan insuficientes, deben aplicarse métodos de control poblacional. Éstos se deben concretar en mayores cupos de extracción y su efecto debe medirse mediante mejoras en los indicadores poblacionales, de condición física y de estado sanitario. Estas medidas también serían aplicables a regiones de baja densidad de ungulados (como las atlánticas), donde se ha observado que las densidades de ungulados aumentan año tras año.

Control poblacional selectivo

Una alternativa más amable que la eliminación no selectiva es la eliminación selectiva. Ésta consiste en la eliminación de los sujetos infectados de modo similar a la llevada a cabo en los programas de testado y eliminación aplicados en animales domésticos. En fauna silvestre, este procedimiento puede ser muy costoso y su viabilidad depende del acceso a los animales, de la disponibilidad de test diagnósticos específicos y sensibles, de la prevalencia inicial y de la distribución espacial de la población diana. En la práctica, es una técnica limitada a situaciones de granja y afines, ya que en su aplicación a fauna silvestre no ha demostrado eficacia y además resulta muy complicada (Che'Amat et al., 2016b).

Vacunación

La vacunación de animales domésticos, más sencilla que la de animales silvestres, se aborda en los capítulos 4.4.4. y 4.4.5. de este libro. Desafortunadamente, en España la vacunación de reservorios silvestres no parece viable a corto plazo porque no existe la vacuna perfecta (siempre necesitará otras actuaciones paralelas), porque vacunar fauna resulta caro si se pretende una buena tasa de vacunación, y porque existen dificultades normativas relacionadas con la consideración, o no, de *M. bovis* inactivado por calor como medicamento.

Zonificación y compartimentalización

La zonificación consiste en definir zonas de mayor o menor riesgo epidemiológico en relación con un determinado problema sanitario, a fin de gestionarlas de forma diferenciada. La compartimentalización es similar, pero se refiere a sistemas de manejo. Por ejemplo, cabe diferenciar los vallados cinegéticos con suplementación de los terrenos vallados sin suplementación y de los espacios cinegéticos abiertos, y gestionarlos de forma diferenciada. De hecho, el PATUBES (MAPA, 2017) ya contempla una cierta zonificación, al definir las llamadas “zonas PATUBES” de mayor a menor riesgo epidemiológico, y también una compartimentalización, al distinguir entre tipos de explotación o tipos de espacio natural. En concreto, el Real Decreto 138/2020 define las siguientes categorías de espacios en los que habitan especies cinegéticas:

- a) Espacios de categoría I: Granjas cinegéticas y núcleos zoológicos que disponen de instalaciones adecuadas para el manejo de los animales y la realización de pruebas sanitarias.
- b) Espacios de categoría II: Terrenos cinegéticos que disponen de una cerca perimetral impermeable para las especies cinegéticas existentes en su interior, con aporte sistemático de alimento o de agua.
- c) Espacios de categoría III: Terrenos cinegéticos que disponen de una cerca perimetral impermeable para las especies cinegéticas existentes en su interior, pero sin aporte sistemático de alimento o de agua.
- d) Espacios de categoría IV: Terrenos cinegéticos no incluidos en las categorías I, II y III, así como los Parques Nacionales, donde sus gestores aplican un programa de control de ungulados.

En base al espacio se proponen diferentes actuaciones, más o menos estrictas, con el fin último de controlar esta enfermedad en la fauna silvestre. Se trata en definitiva de disminuir en lo posible los riesgos de transmisión, para así, disminuir la incidencia de la TB, en preocupante aumento en los últimos años.

4.4.3. Co-infecciones y otras fuentes de inmunosupresión

Javier Hermoso de Mendoza

En cualquier enfermedad animal objeto de programas de erradicación, un proceso inmunosupresor concomitante, tiene como mínimo una triple repercusión que entorpece, si no impide, el éxito de aquellos: por un lado, las infecciones son difícilmente controlables por el organismo afectado y la transmisión del agente infeccioso y las nuevas infecciones se facilitan; en segundo lugar, las infecciones son más difíciles de diagnosticar por procedimientos inmunológicos de cualquier tipo, resultando aparentemente sanos animales que están infectados; y por último, si hay alguna posibilidad de vacunación con la finalidad de evitar la infección en animales indemnes o de controlarla mejor en entornos enzoóticos, las posibilidades de éxito se reducen enormemente, creándose una sensación de seguridad que no es real.

Estrictamente hablando, el término “inmunosupresión” es quizá inadecuado para lo que estamos tratando aquí, pues resulta excesivamente restrictivo. Según el Diccionario de la Lengua (RAE, 2014) suprimir es “Hacer cesar, hacer desaparecer” y ciertamente no es necesario que desaparezca por completo la inmunidad para que se produzcan las mencionadas repercusiones. De cualquier modo, aunque seguro que es más exacto “inmunodeficiencia” o “inmunocompromiso”, todos son términos largos e incómodos para usar repetidamente en un texto, por lo que emplearemos las siglas IS, sabiendo que nos referimos a una “pérdida de eficacia” importante, pero no necesariamente absoluta, del sistema inmunitario.

Las razones por las que cualquier especie animal mamífera puede sufrir IS son variadas, pero debemos recordarlas para acotar el terreno inicialmente amplio en el que nos movemos. La razón “fisiológica” o natural de mayor importancia es la edad. Los mamíferos recién nacidos tardan un número variable de semanas, según la especie, en tener un sistema inmunitario operativo y autónomo. En ese periodo dependen de sus defensas innatas y de las que su madre les haya podido transferir a través del calostro, la primera secreción láctea, rica en anticuerpos maternos, a la que tienen acceso durante unas 10-15 hasta 24 h tras el parto. Durante ese tiempo su intestino está “abierto” a la absorción masiva de estas proteínas inmunitarias (inmunidad pasiva natural). Estos anticuerpos quedan circulantes en sangre y van desapareciendo progresivamente a lo largo de 4-5 semanas, a consecuencia de las reacciones con sus antígenos, o bien, acaban siendo catabolizados “sin usar” y para cuando la mayoría han desaparecido ya deberían haberse activado las propias defensas del animal. Por tanto, durante un mes o mes y medio, el joven animal presenta IS, que si está sano, se corrige con el desarrollo definitivo de su sistema inmunitario.

En el otro extremo de la edad, puede estar la edad senescente, entendiendo por tal la edad en la que los animales de cada especie se pueden considerar viejos, con un sistema inmunitario desgastado o agotado tras una larga vida de avatares sanitarios y vacunaciones. Entre las especies domésticas en la que la TB tiene mayor impacto, una gestión ganadera moderna puede dificultar mucho que encontremos animales viejos. Los animales mayores en cualquier explotación de cría o ciclo completo son los reproductores, que con el paso del tiempo van perdiendo no solo inmunidad, sino también productividad, especialmente la capacidad para reproducirse eficientemente y de alimentar adecuadamente a sus crías. Por estas razones se hace aconsejable la sustitución de los animales mayores, el desvieje en términos tradicionales, y su reposición con animales jóvenes sexualmente maduros. Los sistemas de producción animal en los que la edad de desvieje se retrasa son aquellos en los que los objetivos productivos son más relajados, como las explotaciones extensivas de bovinos y pequeños rumiantes, en las que se cumple el objetivo básico de uno o dos partos por año, respectivamente, y una o dos crías por parto, según la especie. Con los bovinos nos podemos encontrar, con relativa facilidad, vacas por encima de los 16 años de edad cumpliendo sus objetivos puntualmente. En el caso de los ovinos y caprinos, si están bien gestionados, se tiende a desviejar relativamente pronto (antes de los 7 u 8 años), pues con el avance de la edad suelen perder fertilidad y prolificidad, y acumular enfermedades crónicas. Con el porcino extensivo se es mucho más exigente en cuanto a rendimientos reproductivos y en cuanto al valor y aprovechamiento rentable del animal de desvieje, por lo que es difícil encontrar cerdas de más de ocho partos, mientras que los verracos se sacrifican mucho antes (no más de 5 años).

En el caso de la TB se empieza a recomendar el desvieje adelantado en los bovinos de modo que no haya animales de más de 12 años (MAPAMA y VISAVET-UCM, 2018), como edad de compromiso para no perder rentabilidad y evitar el mayor riesgo de que sufran IS y sean portadores anérgicos de TB.

Otras razones importantes que pueden causar IS en los animales tuberculosos se pueden resumir en causas contagiosas y nutricionales. Por causas contagiosas entendemos co-infecciones, tanto por agentes infecciosos como parasitarios. Estas causas pueden concurrir y complicar la IS relacionada con edades juveniles y senescentes. Las especies animales a las que nos vamos a referir especialmente son grandes ungulados domésticos como bovinos, caprinos, ovinos y porcinos, y silvestres, como cérvidos y jabalíes.

Inmunosupresión por causas contagiosas, co-infecciones

Entre las causas de IS más frecuentes destacan las infecciones por virus que utilizan mecanismos de modulación inmune para establecer infecciones latentes, subclínicas o crónicas, lo que garantiza su supervivencia prolongada en el

hospedador y/o en su rebaño. Los parásitos también requieren para sobrevivir en sus hospedadores un efecto inmunosupresor importante. Debemos considerar también el caso especial de la PTB, una infección entérica crónica cuyos efectos pueden mimetizar los de una malnutrición, consecuencia del síndrome de malabsorción que la acompaña. Adicionalmente, esta infección conlleva reactividad cruzada en las pruebas diagnósticas de TB, aspecto que se revisa en el capítulo 4.2.3. de este libro.

Entre los virus, destacan por su prevalencia los *Herpesvirus*, como el bovino tipo I (BoHV-1), causante de la rinotraqueítis infecciosa bovina/vulvovaginitis (o balanopostitis) pustular infecciosa (Nettleton y Russell, 2017) y el *Herpesvirus* porcino de la enfermedad de Aujeszky (ADV) (Pejsak y Truszczynski, 2006), el *Pestivirus* bovino causante de la diarrea vírica bovina (BVDV) (Dubovi, 2018), el *Orbivirus* causante de la lengua azul (BTV) (Umeshappa et al., 2010), y el *Circovirus* porcino tipo 2 (PCV-2) (Segalés et al., 2006).

Si atendemos a las “estrategias” biológicas de los diferentes virus, básicamente les permiten asentarse en los organismos y/o poblaciones animales de forma que su perpetuación como especie quede garantizada. Por tanto, aunque el resultado puede ser la muerte del animal, quedando limitada la dispersión posterior del agente, el verdadero éxito biológico de la infección vírica consiste en superar la respuesta inmune innata por un periodo desde unas horas a pocos días, hasta que se establezca una respuesta inmune adquirida capaz de eliminar el virus circulante. Durante ese breve periodo, el animal puede estar febril, sin que ese síntoma destaque necesariamente en ganado extensivo, y el virus podrá replicarse masivamente en el organismo vivo, eliminándose por distintas vías contagiando a otros animales y contaminando el entorno. Esta amplia multiplicación sirve también para garantizar la entrada del virus a territorios orgánicos del animal infectado menos accesibles al sistema inmunitario, donde queda acantonado. De este modo, una vez barrido el virus circulante por la respuesta adquirida humoral, quedará como portador inaparente, como ocurre con los *Herpesvirus* acantonados en los ganglios nerviosos (del trigémino o del sacro), desde donde, si las defensas bajan, se liberan pudiendo multiplicarse de nuevo, e iniciando un nuevo ciclo de infecciones hasta que la inmunidad los vuelve a eliminar (Nettleton y Russell, 2017). También puede ocurrir, si se trata de una hembra gestante, que el virus alcance al feto, generando aborto, parto prematuro o mortinatalidad con lo que se asegura al menos una enorme dispersión de virus en el momento del parto. En la infección por BVDV, si la infección por cepas no citopáticas ocurre entre las 8 y 18 semanas de gestación, sin estar desarrollado su sistema inmune, los fetos pueden seguir adelante en su desarrollo, quedando como animales persistentemente infectados (PI) por BVDV (Dubovi, 2018). Estos PI resultan seronegativos a la cepa infectante y son capaces de eliminar el virus al entorno, facilitando así el contagio de otros animales.

La cuestión crucial es que durante el inicio de cada infección, o en cada ciclo de reinfección desde sus localizaciones de resistencia en el caso de los *Herpesvirus*, las defensas innatas son burladas o superadas por la propia multiplicación del virus, que suele utilizar las mismas células inmunes como maquinaria de replicación, las cuales resultan finalmente destruidas por fenómenos de apoptosis, lo que suele causar intensa linfopenia (*Herpesvirus*, *Circovirus*, *Pestivirus*, *Orbivirus*). En algunos casos, se recurre simultáneamente a sofisticados mecanismos de inmunoevasión, como en el caso del BHV-1, que en cuanto empieza a replicarse produce uno de sus componentes de envoltura, la glicoproteína G (gG), capaz de mimetizar a una variedad de quimiocinas. Así la gG bloquea los receptores celulares de numerosas interleucinas con gran afinidad, lo que reduce enormemente la eficacia de la señalización celular en la respuesta inmune innata inicial (Bryant et al., 2003).

En las co-infecciones, cada patógeno intenta poner en marcha sus propios mecanismos de supervivencia y multiplicación, a veces interferentes o incluso antagónicos con los de los otros patógenos concomitantes (parásitos, con respuestas Th2, opuestas a las Th1 iniciales del MTBC) (Risco et al., 2014), y a veces sinérgicos y favorables a los diferentes patógenos (bloqueo, retardo o disturbio de la respuesta LTh1). Durante unas horas hasta días, la destrucción masiva de células inmunitarias en el proceso de replicación vírica y la ineficiencia de las interleucinas, pueden motivar que algún animal infectado de TB no responda adecuadamente a las pruebas de tuberculina y/o IFN- γ . Estas infecciones, instaladas enzoóticamente en un rebaño pueden determinar que de forma intermitente se vayan produciendo saneamientos negativos, a pesar de haber animales infectados por MTBC. No se puede obviar el impacto que las co-infecciones pueden tener en el saneamiento bovino, conocida la falta de planes sanitarios correctos en muchas ganaderías. Hay que resaltar que no es tanto un efecto de altas prevalencias como de presencia casi constante (enzoótica) de algún animal con infección inmunosupresora activa. En este sentido, existe bastante bibliografía sobre el efecto de estos agentes víricos inmunosupresores en el desarrollo de la TB (Risco et al., 2014, 2019b) o, en algunos aspectos contradictoria, sobre los efectos en las respuestas a las pruebas diagnósticas oficiales (Charleston et al., 2001; Byrne et al., 2017). Por otra parte, estos mismos mecanismos, coincidentes con primoinfecciones tuberculosas o infecciones ya instauradas, pueden potenciar, en el primer caso, una difusión inicial del agente del MTBC mucho más grave y amplia que si las respuestas innatas del animal estuvieran intactas, mientras que, en el segundo, podrían favorecer generalizaciones tardías de procesos inicialmente controlados, o activaciones de TB latentes. Tampoco puede restarse importancia a las posibles consecuencias en la evolución de la TB por la presencia enzoótica concomitante de las virosis inmunosupresoras, tanto en las poblaciones domésticas como

en las de grandes ungulados silvestres. Para un mejor control y diagnóstico de TB en ganadería y en poblaciones cinegéticas es importante conocer el estatus sanitario de estos procesos, y poner en práctica planes sanitarios, con vacunaciones sistemáticas y desparasitaciones periódicas correctamente ejecutadas y acordes a las condiciones existentes (Figura 67). Estas medidas, imprescindibles en ganadería, pueden llevarse a cabo si es necesario en poblaciones silvestres manejadas (Risco et al., 2018).



Figura 67. Planes sanitarios en poblaciones manejadas de jabalí.
Vacunación contra Circovirus porcino tipo 2 en rayones.

Inmunosupresión por causas nutricionales

La principal causa de IS en rumiantes, por encima de las causas contagiosas, y potencialmente importante en cerdos y jabalíes, es la malnutrición. En estos últimos el problema no es tan acuciante, por ser omnívoros y carroñeros y estar en principio mejor preparados para encontrar recursos de alto valor nutritivo, aunque no necesariamente exentos de riesgos, como el que supone el consumo de cadáveres o restos de animales tuberculosos, con el consiguiente mantenimiento de la TB.

En los rumiantes la alimentación es exclusivamente vegetal, por tanto, están sujetos a una alta dependencia de los recursos naturales, cuya calidad y disponibilidad están muy condicionadas en todo el centro, sur y oeste peninsulares, precisamente las áreas de mayor prevalencia de TB. La calidad nutritiva de los pastos y otros recursos vegetales en estas áreas es en general escasa. Al ser suelos ácidos y además pobres en calcio (Ca), este microelemento no llega en cantidades suficientes a las plantas, ni participa adecuadamente en el intercambio iónico que tiene lugar entre el suelo y las raíces, mucho más eficiente cuando el Ca intercambiable es el catión dominante en el complejo coloidal de la arcilla del suelo. De un buen intercambio iónico radicular depende dramáticamente la capacidad para sintetizar cantidades importantes de proteínas, algo que no ocurre en los suelos ácidos, escasos en Ca y en otros cationes minoritarios como magnesio y potasio (Albrecht, 1958).

En el conjunto de la litosfera terrestre la proporción de Ca es elevada, y sin embargo, el suelo escasea en este elemento en muchas áreas donde geológicamente pudiera estar más favorecida su presencia, por razones como el uso excesivo del suelo, y el lixiviado, proceso que es acelerado por el pH ácido. En Extremadura, por ejemplo, los suelos son predominantemente silíceos y ácidos, lo que se traduce en pobres y poco fértiles. Como ejemplo, sirvan estas determinaciones en suelo de fincas ganaderas y/o cinegéticas de la región (Figura 68).

Muestra	C (%)	Materia orgánica (%)	N (%)	C/N	P-Olsen mg/Kg	Na (mg/kg)	Mg (mg/kg)	K (mg/kg)	Ca (mg/kg)
1	2,6	4,4	0,2	11,1	4,15	84,7	122,8	275,7	484,2
2	3,3	5,7	0,3	10,7	4,15	143,6	143,3	109,3	365,6
3	2,8	4,8	0,3	10,7	5,25	85,9	71,9	95,6	408,0
4	2,8	4,8	0,2	13,3	7,61	106,1	141,3	109,9	422,8
5	3,5	6,0	0,3	14,0	3,67	48,4	142,9	96,5	995,0
6	4,4	7,6	0,3	14,6	15,82	41,9	216,6	178,0	1336,6
7	1,9	3,3	0,2	9,6	3	38,1	123,4	116,4	592,8
8	1,8	3,1	0,2	9,6	1,96	37,0	103,5	102,8	523,6
9	1,8	3,2	0,2	8,8	5,89	81,3	104,8	401,1	242,3
10	1,5	2,5	0,2	8,2	7,01	37,1	82,7	224,1	409,5
Media	2,6	4,5	0,2	11,1	5,9	70,4	125,3	170,9	578,1

Figura 68. Determinación de Calcio (Ca) y otros cationes en suelos de Extremadura.

El valor medio de Ca en suelo obtenido en el análisis es de 578,1 mg/kg, muy bajo en comparación con los valores de fertilidad normales para un suelo arenoso, de 1202 mg/kg, para un suelo medio, de 1803 mg/kg, o para un suelo arcilloso, de 2404 mg/kg.

El Ca^{++} adsorbido a la superficie cargada negativamente de los coloides de arcilla puede intercambiarse con la solución acuosa presente en el suelo, donde la mayor parte del Ca^{++} libre forma compuestos casi insolubles con otros elementos como el fósforo, por lo que también resultan empobrecidos en este elemento. Los canales de iones por los que entra en la raíz de las plantas son permeables al Ca^{++} , mediando ciertas proteínas en esta captación (Demidchik y Maathuis, 2007). En la planta, el Ca^{++} tiende a quedar secuestrado en la vacuola de las células maduras (McAinsh y Pittman, 2009). Esto lo lleva a cabo una proteína de la familia $\text{CAX H}^+:\text{Ca}^{++}$, una proteína *antiporter* (que transporta cationes Ca^{++} hacia adentro de la célula a cambio de sacar H^+). Otros transportadores, como los que cargan parte del Ca^{++} en el xilema, se desconocen, pero en el sistema vascular la movilidad del Ca^{++} es escasa.

El Ca^{++} en la planta tiene funciones estructurales y de mensajero. El Ca^{++} forma fácilmente complejos con grupos de carga negativa de compuestos orgánicos, como fosfatos y carboxilos de fosfolípidos, proteínas y azúcares. En la pared celular de las plantas las microfibras de celulosa están ligadas transversalmente por glucanos y pectinas. Las pectinas de fibras adyacentes se combinan electrostáticamente con Ca^{++} , lo que confiere rigidez a las paredes celulares. Algo parecido ocurre en las membranas celulares, donde el Ca^{++} se coordina con los grupos fosfato de los fosfolípidos, sobre todo en la cara externa. Si se pierde el catión Ca o se reemplaza con otros cationes se compromete de inmediato la integridad de la membrana, perdiéndose agua y electrolitos. El Ca^{++} también media en el huso mitótico durante la división celular, y es cofactor en múltiples rutas metabólicas en la síntesis de proteínas y otros compuestos que tienen que ver con el crecimiento de la planta. Las bajas concentraciones del catión Ca en el citosol lo hacen un mensajero secundario idóneo, sensible a situaciones de estrés biótico y abiótico, a daños físicos y a diversos estímulos hormonales (Maathuis, 2009). Todos estos hechos explican que las plantas que crecen en suelos pobres alcanzan pobre desarrollo, con largas raíces, resultando mucho más frágiles ante los agentes físicos, y siendo nutricionalmente más pobres para los animales.

Por tanto, en suelos predominantemente silíceos hay que asumir que una alimentación exclusivamente a pasto no aporta suficientes cantidades de proteínas ni, lógicamente, suficientes cantidades de Ca fácilmente asimilable por los animales, ya que difícilmente se incorporan niveles suficientes a las estructuras vegetales. El catión Ca que las plantas consiguen incorporar va en parte ligado a proteínas, siendo el más biodisponible para el animal que lo ingiere. Determinadas plantas lo acumulan en forma insoluble, oxalatos principalmente, que no pueden aprovecharse por el organismo animal como fuente de Ca^{++} .

En tales circunstancias hay dos fenómenos claramente decisivos en los pastos naturales del centro, sur y oeste peninsular, a saber, primero, que *per se* no

constituyen una nutrición suficientemente cargada de proteínas y, en segundo lugar, que no proveen minerales básicos como el Ca en la cantidad necesaria (Figura 69). Ambos componentes son “materiales de construcción” que deben ser suficientes para los requerimientos de animales de gran desarrollo corporal, que estén en crecimiento o que estén alimentando a crías lactantes. Y las proteínas son, además, componentes esenciales para el sistema inmunitario: interleucinas, receptores celulares, anticuerpos... Es una práctica habitual aportar piensos o correctores vitamínico-minerales a los animales en cría extensiva a fin de paliar las carencias del suelo, pero esto se hace preferentemente en verano, cuando falta alimento natural en el campo. Sin embargo, no se tiene en cuenta que, incluso en épocas de pasto verde y abundante, salvo que esté creciendo en suelos fertilizados o con pH corregido, la cantidad de proteínas y Ca que, entre otros componentes, puedan aportar estas plantas, no bastaría para cubrir todas las necesidades del animal. Sería pues importante hacer aportaciones de pienso enriquecido en dichos nutrientes, en cantidades más discretas en época de abundancia, y más abundantes en época seca, de modo que la condición corporal de los animales fuera la correcta y no variase sensiblemente entre estaciones.



Figura 69. Pradera mejorada (fertilización, siembra) para alimentación de ganado o especies cinegéticas.

Relacionada con la disponibilidad del Ca en la dieta está la necesidad de unos niveles suficientes de vitamina D₃ que permitan su aprovechamiento, por absorción del elemento a nivel intestinal o renal o por su movilización desde sus depósitos óseos. Ya hace tiempo que se demostró el efecto beneficioso de la vitamina D₃ contra la TB, incluyéndose esta sustancia en las terapias clásicas contra dicha enfermedad en la especie humana. Como es sabido, los rayos ultravioleta de la luz solar facilitan la transformación en vitamina D₂ (ergocalciferol) a partir de sus precursores (ergosterol) en las plantas, y de la vitamina D₃ (colecalfiferol) a partir de sus precursores (7-dehidrocolesterol) en los animales. La 25 hidroxivitamina D₃ que se genera en estas transformaciones es una prohormona que se transporta por una proteína de unión a vitamina D (VDBP) y que se convierte en su forma activa, la 1,25 dihidroxivitamina D₃, en el riñón, por acción de la 1 α -hidroxilasa. Esta transformación ocurre también en el tejido granulomatoso (O'Garra et al., 2013). Así, las células presentadoras de antígeno, macrófagos y dendríticas, los linfocitos T y B tienen la maquinaria necesaria para sintetizar y responder a la 1,25 dihidroxivitamina D₃, por lo que la vitamina D puede actuar de forma paracrina y autocrina en un entorno inmunitario. Más aún, los niveles locales de 1,25 dihidroxivitamina D₃ pueden diferir de los sistémicos, circulantes, dado que la regulación local de enzimas que sintetizan e inactivan la vitamina D₃ es diferente del control que se establece desde el riñón. La enzima 1 α -hidroxilasa de los macrófagos es distinta de la renal y, a diferencia de ésta, no es regulada por la paratohormona (PTH) (Wu et al., 2007). En cambio, depende de los niveles circulantes de 25 hidroxivitamina D₃, o puede ser inducida por citoquinas como el IFN- γ , la IL1 o el TNF- α (Aranow, 2011). 1,25 dihidroxivitamina D₃ tiene muchos efectos reguladores y antiinflamatorios, incluyendo el antagonismo con el perfil inmunitario Th1 inducido por *M. tuberculosis*, que es necesario para la protección de la enfermedad. No obstante, como se ha visto en humanos, la 1,25 dihidroxivitamina D₃ actúa sinérgicamente en la restricción del crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* mediada por IFN- γ (Fabri et al., 2012). La unión a los receptores Toll-like 2 (TLR2) induce una α -hidroxilasa promoviendo también, por mediación de la 1,25 dihidroxivitamina D₃, el péptido antimicrobiano catelicidina, que restringe, directamente y por autofagia, el crecimiento de *M. tuberculosis*. En bovinos, el mecanismo es similar, aunque tienen muchas más vías para producir este péptido que la especie humana. No obstante la 1,25 dihidroxivitamina D₃, producida por la α -hidroxilasa en los monocitos de los bovinos, estimula significativamente los niveles locales de iNOS (óxido nítrico sintasa) y RANTES (*Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*, una quimiocina) en los focos de infección (Nelson et al., 2011), con marcados efectos antimicrobianos la primera y de reclutamiento de monocitos y linfocitos T la segunda.

Aunque la exposición a los rayos solares es extraordinaria en las principales zonas españolas con carencia de Ca en el suelo, los niveles plasmáticos de hidroxivitamina D₃ que se observan no son elevados (Benítez-Medina et al., 2018). A ello puede contribuir el hecho de que la demanda orgánica de vitamina D₃ supere significativamente el suministro. Si aceptamos la carencia general de Ca⁺⁺ en los suelos del centro, sur y oeste peninsulares, la vitamina D₃ ha de ser utilizada constantemente por el organismo animal para múltiples funciones, incluyendo movilizar el Ca⁺⁺ del hueso, o captarlo del intestino o del túbulo renal. El Ca⁺⁺ recuperado se consume en cantidades importantes para la producción de leche (las madres), para el desarrollo óseo (las crías en gestación y animales en crecimiento) y para otras funciones vitales para el individuo. Por tanto, si no hay un aporte regular y suficiente de vitamina D₃, y resulta pobre el suministro de Ca⁺⁺ en la dieta debido a su escasez en el suelo, los niveles plasmáticos de la vitamina pueden estar frecuentemente en niveles insuficientes.

La capacidad de 1 α -hidroxilasa de monocitos y células B para sintetizar 1,25 dihidroxivitamina D₃, y para regular posteriormente las respuestas inmunes en las que media, depende de la disponibilidad de 25 hidroxivitamina D₃. La concentración circulante de la prohormona está regulada principalmente por la ingesta dietética de vitamina D₃ y la exposición al sol. En humanos y en bovinos se recomiendan concentraciones circulantes de provitamina entre 20 y 50 ng/ml, pero se ha comprobado que se pueden requerir concentraciones por encima de 30 ng/ml para una función inmune óptima (Adams y Hewison, 2010). En humanos es generalizada la insuficiencia de vitamina D₃ (concentración en suero por debajo de 30 ng/ml) e incluso la deficiencia (por debajo de 20 ng/ml) es frecuente. En experiencias realizadas con bovinos de Extremadura, los niveles séricos naturales de vitamina D₃ siempre están en el rango de la deficiencia (Benítez-Medina et al., 2018). Se ha demostrado que las respuestas inmunes innatas reguladas por 1,25 dihidroxivitamina D₃ aumentan linealmente con concentraciones plasmáticas crecientes de 0 a 125 ng/ml de 25 hidroxivitamina D₃ (Nelson et al., 2010).

Con estas evidencias presentes, sería conveniente asegurar no solo un nivel suficiente de provitamina D₃ plasmática, superior a 30 ng/ml, sino un mantenimiento del mismo, y eso es algo que de forma natural no logran los rumiantes criados en extensivo en las zonas más afectadas por la TB, por lo que debería aportarse de forma sistemática en la dieta. Si bien el aporte de niveles suficientes y mantenidos de provitamina D₃, y de Ca, es algo que se contempla de forma rutinaria en la nutrición del bovino lechero, dada la necesidad constante de movilización de Ca que se requiere para la producción láctea, nunca se ha considerado esta necesidad en el bovino no lechero. Esta política debería cambiar radicalmente, dada su importancia para el desarrollo óseo adecuado

de los animales de gran talla típicos de la aptitud cárnica y, sobre todo, para una correcta función inmunitaria, que puede tener un impacto considerable en el control de procesos transmisibles a los que se exponen los animales en cría extensiva, entre otros, la TB.

Esta necesidad de aporte dietético, plenamente justificada en el ganado doméstico, tiene que ser matizada en cuanto a la forma de realizarse en cualquier especie, y también en cuanto a la conveniencia de hacerlo o no sobre grandes ungulados de interés cinegético. En este sentido, el aporte de alimentación rica en proteínas, en determinados minerales como el Ca, y en diversas vitaminas potencialmente favorables a una correcta función inmunitaria, incluyendo la vitamina D₃, a ganado criado en extensivo debe entenderse como una mejora nutricional (Figura 70). Como tal, se basa en alimentos enriquecidos con cantidades moderadas de esos componentes insuficientes, emulando el aporte que de forma natural pudiera obtenerse con alimentación a pasto de calidad. El objetivo es que el animal obtenga lo necesario para una correcta función inmunitaria, reproductora, etc., lo que en principio ayudaría a mejorar su respuesta inmunitaria, que, en el caso de la TB animal, supondría controlar mejor las lesiones (menor excreción de bacilos) y en los domésticos permitiría a los infectados reaccionar antes a las pruebas diagnósticas, con evidentes ventajas para las campañas de saneamiento. No se trata, pues, de un medicamento a modo de antimicrobiano que en un tratamiento breve usando dosis elevadas pueda impedir la infección de los animales sanos, permita curar al animal infectado/enfermo de TB o impida por completo que infecte a otros. Los excesos de cualquier compuesto, sean proteínas, minerales o vitaminas en una dosificación forzada, pueden tener consecuencias desastrosas, muy alejadas del objetivo de mejora perseguido. Está comprobado que la hipervitaminosis D causa depósitos renales de calcio, que pueden afectar al metabolismo de este catión y a los niveles plasmáticos de la propia vitamina D₃. El riñón es un órgano clave en el metabolismo de la vitamina D₃, y, como se ha visto recientemente en cabras (Risalde et al., 2019), el daño renal provoca una menor concentración plasmática de 1,25 dihidroxivitamina D₃ en animales hipervitaminados que en animales control bien alimentados, probablemente por verse afectada la hidroxilación renal. Habría, por tanto, unas repercusiones metabólicas importantes derivadas de la sobredosificación, que dificultan calificar como beneficioso el efecto de la vitamina D₃ en el control de la TB. No obstante, en el mismo experimento se constatan indicios de mejor y más rápida respuesta inmunitaria frente a la TB, que deberían confirmarse con nuevos experimentos, comprobando, antes de iniciar la suplementación, que los animales del estudio padecen insuficiencia de dicha vitamina, como ocurre en el campo, para suministrarla a continuación de forma moderada pero constante durante un periodo amplio, tal como se propone para la alimentación animal en extensivo.



Figura 70. Grupo de bovinos alimentándose con piensos mejorados en época seca.
Se utilizan comederos localizados en un área vallada aislada del acceso de grandes ungulados silvestres.

Para terminar, la conveniencia de suministrar piensos equilibrados en grandes ungulados de interés cinegético es obvia en poblaciones gestionadas en fincas cerradas, con sistemas de alimentación diferencial y separada en caso de coexistir con ganadería doméstica. El suministro ha de ir acorde con la densidad de población idónea para las características de la finca y para la necesaria conservación de la cubierta vegetal. La mejora nutricional, lógicamente, repercutirá en la sanidad de las poblaciones silvestres, como ocurre en domésticos, en la calidad de los trofeos y en la calidad ecológica del entorno. Lo que no tiene sentido es la suplementación de poblaciones de fincas abiertas como medida general, dado que los animales entran y salen libremente en ellas, lo que difícilmente beneficia a quien suministre el alimento, mientras que potencia la sobrepoblación y el riesgo de contagios a partir de las agregaciones en los puntos de suministro (Castillo et al., 2011). Una práctica usual en este tipo de fincas abiertas, que nada tiene que ver con mejoras nutricionales, es el suministro alimentario puntual en periodos de tiempo breves, con fines de “cebado” o de atracción a zonas concretas de los animales silvestres de un área. Este cebado tiene una utilidad evidente para aumentar el número de capturas en una acción cinegética. Sin embargo

entraña un riesgo grave de contagios interespecíficos e intrapoblacionales que solo se justifica si, efectivamente, el número de capturas es suficientemente elevado como para controlar la sobrepoblación en el área, lo que sí constituye una medida útil para el control de la TB silvestre. En todo caso, tales medidas deberían estar sujetas a control y evaluación de efectos en las poblaciones tras su aplicación (Hermoso de Mendoza et al., 2019).

No se puede obviar que la IS, sea del origen que sea, puede tener un efecto nefasto en la evolución de la TB en el organismo animal infectado, en el control de la TB animal silvestre y en su erradicación en la ganadería. La situación es más desesperante cuando a suelos y pastos pobres se suma un manejo alimentario deficiente, por ignorancia o por pasividad del ganadero/gestor cinegético, y unos planes sanitarios inexistentes, insuficientes o mal aplicados. Si tenemos en cuenta que los problemas que generan IS se superponen en muchos casos, es probable que un nuevo plan sanitario correctamente diseñado no sirva de nada si no lleva en paralelo una mejora nutricional, que permita que las respuestas inmunes se vean potenciadas y aumente la eficacia de vacunaciones y desparasitaciones. En el mismo sentido, las vacunas candidatas frente a la TB en especies silvestres manejadas de fincas cerradas, pueden mejorar sus efectos si los animales están sometidos a alimentación mejorada y están controladas las posibles infecciones por agentes inmunosupresores. Con el control de la IS podrían resolverse, quizá, una proporción importante de situaciones de infecciones tuberculosas residuales y ganaderías positivas persistentes, pudiendo calificarse antes las explotaciones, y reducirse considerablemente los perjuicios que la TB ocasiona al sector cinegético, con una mejora importante de calidad de trofeos y canales y una considerable reducción de decomisos.

4.4.4. Vacunación en animales domésticos

Ramón Juste, Joséba Garrido, Bernat Pérez de Val, Iker A. Sevilla

La TB fue de las primeras entidades patológicas en las que se demostró el papel de una bacteria como causa de enfermedad y, por tanto, tuvo una contribución sustancial a la consolidación de la teoría microbiana de la enfermedad (Barberis et al., 2017). Ese avance en el conocimiento de la causa de las enfermedades infecciosas, junto con la observación empírica de que los individuos que superaban algunas de ellas, no volvían a sufrirlas, proporcionó la base teórica para iniciar el diseño científico de las vacunas, que han constituido la gran revolución de la medicina que ha cambiado la historia de la humanidad (Gherardi, 2007). Los esfuerzos para desarrollar una vacuna que protegiese contra la TB se iniciaron

inmediatamente y, al cabo de dos décadas, ya se contaba con una importante experiencia sobre la vacunación contra la TB que culminó con el desarrollo de la vacuna que, basada en la atenuación por pases sucesivos realizada por Calmette y Guérin de un cultivo de *M. bovis* (Luca y Mihaescu, 2013), ha constituido y sigue constituyendo la principal herramienta médica para el control poblacional de la TB humana. Aunque las dudas sobre la unicidad o la duplicidad del agente etiológico pudieron causar algún retraso, esta vacuna tenía un claro potencial para su uso en animales y, en particular, en la especie doméstica reina en el desarrollo de las civilizaciones euroasiáticas y principal víctima reconocida de la TB, la bovina (Domínguez y Bezos, 2014). Una derivación de los esfuerzos de tratamiento vacunal, el desarrollo de la administración intradérmica, fue la causa de que la comunidad médica, en una evaluación en la línea del actual “un mundo, una salud” decidiese que la estrategia de saneamiento se impusiese mundialmente a la de vacunación en lo que a la TB bovina se refiere (Good et al., 2018). A la vista del papel clave que la vacunación ha jugado en las dos únicas enfermedades infecciosas actualmente erradicadas de la faz de la tierra, viruela (WHO, Smallpox, 2018) y peste bovina (OIE, 2013), la pequeña fracción de TB humana causada por *M. bovis* y la elevada prevalencia actual de la TB en algunas regiones, pese a las inversiones millonarias realizadas, en la actualidad la comunidad médico-veterinaria se replantea si una estrategia vacunal usada con rigor científico no debería ser parte clave de la lucha contra la TB (“Scientific Opinion on field trials for bovine TB vaccination” EFSA, 2013b; Nugent et al., 2017; Buddle et al., 2018; Conlan et al., 2018). En esta sección revisaremos los conocimientos científicos en los que basar una discusión sobre este tema y contemplaremos las herramientas actualmente a nuestra disposición para acercar un futuro sin TB en los animales domésticos.

Tipos de vacunas

Vacunas vivas

Los resultados de la experimentación en los primeros años de investigación desde las primeras vacunas de Maragliano y von Behring, llevaron a la conclusión de que las vacunas inactivadas no proporcionaban protección satisfactoria y, por ello, se centraron todos los esfuerzos en el desarrollo de vacunas vivas, entre las que se encuentra la desarrollada por Calmette y Guérin en Francia a principios del siglo XX, que rápidamente se impuso a cualquier otra alternativa (Martini et al., 2018). Esta vacuna se desarrolló a lo largo de 13 años por este equipo médico humano y veterinario mediante la realización de 230 pases en cultivos artificiales de un aislado del bacilo de origen bovino, posteriormente caracterizado como *M. bovis* (Luca y Mihaescu, 2013). El resultado fue una cepa atenuada, la BCG (biliada de Calmette et Guérin), que se distribuyó por

laboratorios de todo el mundo para la producción local y que, debido a su mantenimiento mediante pases, ha ido divergiendo en varias nuevas hasta que se empezó a trabajar con cultivos madre congelados para mantener siempre la misma genética. La vacuna con BCG viva es el estándar de vacunación contra TB que se ha utilizado en todo el mundo en humanos. Comenzó a utilizarse en 1921 y es probablemente la vacuna más utilizada a lo largo de la historia, hasta que, en los países más desarrollados y con menor incidencia de TB, se pasó de la vacunación universal a la vacunación selectiva (grupos de riesgo) (IUATLD, 1994). Se asume que BCG produce una infección totalmente subclínica, que persiste a lo largo de la vida del individuo vacunado, y que así mantiene en su máxima potencia la eficiencia de la respuesta del individuo frente a nuevas infecciones.

Vacunas inactivadas

Las vacunas inactivadas, también llamadas bacterinas, se vienen usando en enfermedades en las que no se ha conseguido producir una atenuación suficiente del agente como para hacerlas seguras y, en cambio se han podido diseñar estrategias mediante el uso de adyuvantes o aplicaciones repetidas que permitían mantener unos buenos niveles de protección. En otros casos, el uso de estas bacterinas viene determinado por las toxinas que producen las bacterias. La TB y la PTB son casos un tanto particulares puesto que, en realidad se trata de infecciones lentas (Balseiro et al., 2019b) en las que el agente no causa un daño celular directo e inmediato, sino que induce una respuesta inmune en la que los mecanismos de inflamación y necrosis son los responsables del daño tisular acumulativo en plazos que van de días a meses. En consecuencia, las vacunas que no inducen una respuesta completa, equilibrada y persistente no pueden dar los niveles de protección necesarios. Esta diferencia que parece producirse entre las vacunas vivas y las inactivadas, determinó el abandono de mayores desarrollos en los primeros tiempos de la lucha contra la TB, en los que el objetivo era mucho más optimista y el impacto de la enfermedad mucho mayor al carecerse incluso de antibióticos (Calmette et al., 1927; Martini et al., 2018). En esas circunstancias, en las que el éxito de los programas de saneamiento bovino en los que la vacunación con BCG producía una persistente reacción cruzada en las pruebas de diagnóstico, hacía ver innecesario o incluso contraproducente el uso de la vacuna en la que se consideraba única especie epidemiológicamente relevante para la TB humana (Cuezva-Samaniego, 1966; Waters et al., 2012; Buddle et al., 2018). Hoy día, sin embargo, al dar más peso al principio de precaución, por el que debe evitarse incluso el riesgo potencial, y al comprobarse que no ha sido posible erradicar completamente la TB bovina debido a la constatación del papel de otras especies en su mantenimiento (Cousins, 2001; Stevenson et al., 2002), las vacunas inactivadas, por su mayor bioseguridad y menor persistencia de la

reactividad inducida, han vuelto a ser reconsideradas y podrían llegar a constituir la principal arma en la lucha contra la TB animal. Curiosamente, en estos momentos, parece que se produce una divergencia entre la medicina especializada en humana y la generalista veterinaria, al seguir en humana la línea de las vacunas vivas ahora modificadas de forma intencionada (Sei et al., 1994) y específica hacia la eliminación de factores de virulencia (Hawn et al., 2014) y, quedarse la veterinaria entre el uso de la BCG y el desarrollo de nuevas vacunas inactivadas (Garrido et al., 2011; Waters et al., 2012; Beltrán-Beck et al., 2014b; Prieto et al., 2014; López et al., 2016; Buddle et al., 2018).

En todo caso, los desarrollos en medicina humana para los que la financiación es más abundante, son de esperar que, bien mediante el uso de modelos experimentales, bien mediante desarrollo de proyectos específicos para animales domésticos, permitan disponer de bacterias modificadas genéticamente y con los máximos estándares de seguridad y eficacia para las especies domésticas.

Vacunas heterólogas

El éxito relativamente temprano de la vacuna BCG hizo que se prestase escasa atención a las vacunas heterólogas o compuestas por bacterias distintas de las del MTBC, aunque sí se han ensayado con éxito en enfermedades como la lepra, en la que no es posible cultivar el agente. En realidad, solo un ensayo con *M. vaccae* parece preceder los ensayos recientes que han mostrado la protección que pueden proporcionar vacunas como la de la PTB en rumiantes (Buddle et al., 1995b). Por un lado, en cabras, se ha visto que hay un cierto grado de protección (Pérez de Val et al., 2012a) y, por otro, en vacuno se ha observado que la vacunación heteróloga parece proteger más homogéneamente en términos de carga bacteriana y lesiones (con una reducción incluso mayor de éstas), pero a una menor proporción de la población, que las vacunas homólogas de *M. bovis* viva o inactivada (datos sin publicar estos últimos). El limitado uso de esta vacuna en regiones con programas de TB no proporciona tampoco evidencias de campo, aunque cierta evidencia circunstancial en el aumento de la incidencia de la TB en Francia, tras el abandono de la vacunación contra PTB desde principios del siglo XXI, podría interpretarse como indicio de protección cruzada. En España, aunque existe cierta información en las regiones en las que se vacuna de PTB y existe TB en la especie caprina, no parece que se haya hecho un estudio epidemiológico riguroso que pueda arrojar luz sobre este tema. El uso de una vacuna inactivada, ya registrada, merecería la inversión de recursos para vencer el principal obstáculo del desarrollo de nuevas vacunas en especies domésticas, que es el elevado coste y los largos plazos que el registro de nuevos productos biológicos exige hoy día.

Vacunas de fracciones

La profundización en el conocimiento de los mecanismos de la respuesta inmune y la identificación de los antígenos específicos que la desencadenan han permitido diseñar vacunas consistentes en fracciones concretas de los bacilos tuberculosos. Esto inicialmente se lograba mediante técnicas de separación y purificación, pero desde el desarrollo de la ingeniería molecular, es posible producir antígenos específicos en grandes cantidades en condiciones de laboratorio, mucho más precisos y eficientes. Estos antígenos tienen un papel claro en la respuesta inmune y por eso se han ensayado como vacunas. Desgraciadamente, aunque han mostrado un cierto grado de protección, no han llegado a satisfacer los niveles de protección necesarios para hacer que se conviertan en una alternativa práctica, aunque parece que podrían tener una utilidad en regímenes de cebado o recuerdo junto a una vacunación con células enteras (Li et al., 2011; Pérez de Val et al., 2013; Nieuwenhuizen y Kaufmann, 2018; Stylianou et al., 2018).

Terapia de fagos

Aunque el uso terapéutico de los fagos no puede considerarse como una estrategia de tipo vacunal y las experiencias al respecto no han sido muy exitosas, creemos que es importante no perder de vista un abordaje que, como la vacunación, además de ser altamente específico, permite soslayar el uso de antibióticos. Aunque no actúa sobre bacterias ya en el interior de las células del hospedador, podría, por un lado, reducir la exposición aplicando los fagos en el medio ambiente y, por otro lado, debilitar las poblaciones bacterianas lo suficiente como para permitir ganar la batalla inmune al debilitar las poblaciones invasoras y así, no solo inducir la curación, sino también permitir el desarrollo de una respuesta inmune eficaz. En este sentido, no se puede descartar que los fagos constituyan un mecanismo natural oculto de apoyo a la inmunización contra micobacterias. La historia del tratamiento con bacteriófagos comienza en el periodo entre la identificación del origen microbiano de las enfermedades infecciosas y el descubrimiento y desarrollo de los antibióticos, al observar que elementos filtrables eran capaces de destruir las poblaciones bacterianas y, que ese fenómeno, podía ser aprovechado para combatir algunas enfermedades con carácter muy específico. El advenimiento de la era antibiótica con su enorme espectro de actividad y facilidad de administración interrumpió mayores desarrollos y marginó y politizó el uso de la terapia de fagos, que quedó confinada como una arbitrariedad pseudocientífica más del régimen soviético en la antigua URSS. En la actualidad, ante la emergencia de las multiresistencias antibióticas, se está retomando el estudio de esta estrategia terapéutica (Emery y Whittington, 2004; Azimi et al., 2019; Satish y Desouza, 2019) que, de ser eficaz, podría resultar en una buena inmunidad en los individuos en los que se aplicase.

Aplicación y protección

La vacunación contra la TB humana se administró tanto por vía parenteral como oral, siendo la primera vía claramente la más eficaz, y la que se ha venido usando masivamente en todo el mundo (Martini et al., 2018; World Health Organization-WHO, 2018). La administración en los animales, aunque perfectamente viable para los domésticos por vía parenteral, siempre resulta más cómoda por vía oral, por lo que debe prestarse mucha atención a los desarrollos para especies silvestres, en las que ésta es casi la única opción práctica viable en la actualidad por razones de estabilidad del producto y de seguridad biológica de éste (Garrido et al., 2011; Balseiro et al., 2020b). Ensayos recientes muestran que, efectivamente, la vía oral no induce interferencia en el diagnóstico basado en respuesta inmune de la TB bovina (Jones et al., 2016), pero es necesario demostrar que también ofrece una protección satisfactoria.

La vacunación con BCG en ganado bovino se ha utilizado en diversos entornos. En el experimental, se ha visto que la vacunación con BCG proporciona buenos resultados, tanto en términos de reducción de lesiones como de carga bacteriana, aunque, en el caso de la vacunación por vía oral, se ha observado un efecto negativo en términos de lesiones (datos sin publicar) que confirma la importancia de afinar las condiciones de aplicación.

Se han realizado diversos estudios para evaluar la eficacia de la vacunación de bovinos con BCG, en condiciones de campo en países endémicos como Nueva Zelanda, Chile, México y Etiopía, que indican una reducción tanto de la incidencia a medio plazo como de la severidad de la TB en animales vacunados (Ameni et al., 2010, 2018; López-Valencia et al., 2010; Nugent et al., 2017, 2018).

La seguridad, inmunogenicidad y eficacia de la vacunación de caprinos y ovinos con BCG también ha sido estudiada (Pérez de Val et al., 2012b, 2013, 2016; Balseiro et al., 2017; Roy et al., 2019b). La eficacia de la vacunación con BCG en ganado caprino también ha sido confirmada en condiciones de campo (Nielsen et al., 2002; Vidal et al., 2017).

Además de la protección contra TB, se ha observado que la vacunación con BCG en humanos reduce hasta en un 30% la tasa de mortalidad infantil, tanto en países desarrollados como en medios más primitivos (Kleinnijenhuis et al., 2014; Timmermann et al., 2015; Kjærgaard et al., 2016; Aaby et al., 2017; Biering-Sørensen et al., 2017; Welaga et al., 2018). Este efecto, que no ha sido tenido en cuenta suficientemente en la toma de decisiones de salud pública, probablemente se asocie también con el aumento de la prevalencia de alergias en países desarrollados y podría resultar clave para justificar la reinstauración de la vacunación anti-tuberculosa, quizás en su versión inactivada. Este fenómeno de mejora de la supervivencia general se ha señalado también en vacuno con

la vacuna heteróloga de PTB (Alonso-Hearn et al., 2012; Juste et al., 2016b) y podría depender de una activación de la lisis bacteriana en los macrófagos (Juste et al., 2016a), como parte del concepto de inmunidad aprendida recientemente propuesto (Netea et al., 2011; Messina et al., 2019).

Interferencias diagnósticas

La vacunación contra la TB, realizada con bacterias completas, genera respuestas complejas que son detectadas por las pruebas basadas en dicha respuesta. Aunque la respuesta a la propia BCG puede diferenciarse mediante el uso de antígenos más específicos como el ESAT-6 o el CFP-10 (Srinivasan et al., 2019), recientes estudios por grupos españoles han abordado esta cuestión y han mostrado que, al menos en lo referente al uso de la vacuna heteróloga de la PTB, supone una proporción de alrededor de un 1% de las pruebas comparativas realizadas en animales vacunados (Garrido et al., 2013). Estas reacciones cruzadas que, además, tienden a desaparecer al cabo de un año, son fácilmente diferenciadas con el uso generalizado de un algoritmo de interpretación diagnóstica basado simplemente en sustituir los criterios de medidas absolutas por medidas relativas al grosor inicial de la piel (Serrano et al., 2017).

Especies diana

Sin duda, la especie más afectada por la TB es la bovina, en cuyos antecesores se registra la enfermedad desde hace al menos 20.000 años, aunque como víctima secundaria de una bacteria que derivó de la de tipo humano hace unos 65.000 años (Galagan, 2014). No sería extraño que su infección haya sido un factor de presión evolutiva natural en el desarrollo del avanzado sistema inmune humano, que sería un antecedente natural del papel ya intencional de la vacunación con BCG.

La excesiva focalización en la forma y especie más patentes ha generado un exceso de confianza y ha hecho resurgir la TB bovina en los sistemas más extensivos. Esta sería la principal especie diana de la vacunación, una vez establecido el limitado papel epidemiológico de la TB bovina en la TB humana, alcanzados unos niveles de prevalencia suficientemente bajos, pero no nulos, en dicha especie. El informe Godfray (<https://www.gov.uk/government/publications/a-strategy-for-achieving-bovine-tuberculosis-free-status-for-england-2018-review>) alude a la vacunación como parte de la nueva estrategia de control de TB en el Reino Unido.

La siguiente especie en prevalencia de TB es la caprina, en la que incluso se ha diferenciado una especie particular con los laxos criterios de asignación de

especies que se aplican en los complejos clínico-taxonómicos de MTBC y MAC (Aranaz et al., 1999). En esta especie hospedadora, en la que los costes individuales de diagnóstico suponen un porcentaje importante del valor del propio individuo, la vacunación aparece claramente como una herramienta que debe ser tenida en cuenta. Aunque algunos estudios han mostrado resultados poco alentadores, otros han sido más prometedores (Arrieta-Villegas et al., 2018), por lo que todavía es necesario realizar estudios de exposición experimental y epidemiológicos en relación con su versión heteróloga con PTB, ya actualmente en uso.

Otra especie candidata al uso de la vacunación contra TB es la porcina en regímenes de explotación extensivo (Hermoso de Mendoza et al., 2003) o en poblaciones cimarronas (Richards, 1990; Miller y Sweeney, 2013). La producción de porcino en pastoreo, por el contacto con el reservorio silvestre más importante en el área mediterránea, el jabalí, supone un alto riesgo de infección tuberculosa (ver capítulo 4.3.6.), para cuyo control la vacunación podría ser una herramienta muy útil. Esta estrategia se ha ensayado ya en cerdo negro siciliano (datos sin publicar) y en cerdos cimarrones de Molokai (Hawaii, Estados Unido; Nol et al., 2020) con vacuna inactivada, pero necesita más estudios y mejor controlados. Finalmente, dada la reciente evidencia de infección en ganado ovino (Muñoz-Mendoza et al., 2016), se han realizado estudios de infección experimental que indican que la vacunación con BCG vivo proporciona una protección satisfactoria, mientras que el uso de una vacuna oral inactivada parece tener efectos contraproducentes (Balseiro et al., 2017). En este sentido, se necesitan estudios futuros para evaluar la eficacia de la vacuna inactivada por vía parenteral.

En resumen, la vacunación en las especies domésticas es una estrategia que debe ser considerada seriamente. Por un lado, porque las campañas basadas en el saneamiento son extremadamente costosas y, probablemente solo se justifican ya en la especie bovina debido al progreso realizado y a los estándares impuestos a nivel mundial, pero no por su relación coste/beneficio que son determinantes en el control de la TB en otras especies de menor valor individual. Los problemas de interferencia diagnóstica, que son su principal inconveniente, pueden tener solución simple con la modificación del algoritmo de interpretación de la prueba oficial comparativa en el caso de la vacunación heteróloga, o con el uso de reactivos diagnósticos específicos en el caso de la homóloga. Finalmente, debe considerarse que los efectos inespecíficos de la vacunación micobacteriana pueden suponer incluso una razón más importante para el uso generalizado de este tipo de vacunas, especialmente en su versión inactivada, de menor persistencia en el tiempo.

4.4.5. Vacunación en fauna silvestre

M^o Ángeles Risalde, Ramón Juste, Joséba Garrido, Iker A. Sevilla, Christian Gortázar

El control de la TB animal es considerado un factor importante que influye desde una perspectiva “One Health” en aspectos como la salud pública, la sanidad animal, la economía y la conservación de especies. La vacunación es una herramienta clave y efectiva en la aproximación hacia el control integrado de la TB que, junto con la bioseguridad, es una herramienta bien aceptada por la sociedad (Beltrán-Beck et al., 2012). Actualmente no hay vacunas registradas frente a la TB en animales domésticos, mientras que su uso en reservorios silvestres de micobacterias del MTBC podría ser muy valioso con el objetivo de disminuir la carga infectiva, reduciendo la excreción y transmisión del patógeno y limitando así su propagación al ganado doméstico (Buddle et al., 2018; Díez-Delgado et al., 2018). En este sentido, la BCG procedente de *M. bovis* se registró en el Reino Unido en 2010 para su administración por vía intramuscular en tejones (Gov. UK, 2018).

Una cuestión fundamental, cuando hablamos de vacunas de TB, es recordar que éstas no funcionan como una vacuna de la gripe. Una vacuna frente al virus de la gripe induce la producción de anticuerpos neutralizantes que, en condiciones ideales, darán lugar a una protección completa: una inmunidad esterilizante. Las respuestas inducidas por las vacunas para la TB son múltiples, y tan complejas, que aún existe debate sobre los mecanismos de protección implicados. Y en cualquier caso, no confieren una protección completa. Aunque pueda observarse cierta reducción en nuevos infectados, las vacunas de TB sobre todo reducen el cuadro clínico de los infectados y, por tanto, la excreción de micobacterias, por lo que actúan principalmente a escala de rebaño o de población.

Tipos de vacunas

Los ensayos de vacunación frente a la TB comenzaron en vacuno a principios del siglo pasado utilizando la BCG (Bacillus Calmette-Guérin), una vacuna desarrollada por Calmette y Guérin a partir de una cepa viva avirulenta de *M. bovis* (Calmette y Guérin, 1929). Esta vacuna fue distribuida a muchos países en la década de 1920, dando lugar a un considerable número de cepas hijas con diferentes perfiles antigénicos (Behr et al., 1999). La BCG es la única vacuna registrada contra la TB en humanos y su eficacia en el hombre ha sido comprobada. Además, muchos ensayos experimentales llevados a cabo con animales domésticos y silvestres también han demostrado su eficacia, principalmente, en cérvidos, jabalí y tejón (Hope et al., 2011; Dean et al., 2015; Balseiro et al., 2020a, 2020b). En otras especies los resultados han sido contradictorios, observándose ausencia de protección en búfalos

africanos (de Klerk et al., 2010) y una significativa eficacia en zarigüeyas (Tompkins et al., 2009; Nugent et al., 2016). No obstante, el uso de la BCG puede tener una serie de desventajas, como causar interferencia con los test diagnósticos de TB usualmente empleados, dudosa estabilidad en condiciones naturales (Garrido et al., 2011) o posible supervivencia en tejidos y excreción al medio (Palmer et al., 2010).

Las vacunas inactivadas o muertas por formalina han sido utilizadas en muchos modelos animales para luchar contra la TB animal (Griffin et al., 1999; Buddle et al., 2006). Como vacunas inactivadas, se han empleado diversos organismos incluyendo *M. bovis* BCG, la vacuna leprosa, *Mycobacterium w* y *M. vaccae* (Gupta y Katoch, 2009). La BCG inactivada por deshidratación y rehidratación, seguida de autoclavado, no fue eficaz en ciervo (Griffin et al., 1999). Sin embargo, las vacunas de *M. bovis* inactivadas por calor (a más de 80 °C) se presentan como una interesante alternativa en la fauna silvestre, ya que su eficacia ha sido probada en ciervo, tejón y jabalí, siendo en esta última especie donde se han observado resultados más prometedores, tanto en ensayos de laboratorio (Garrido et al., 2011; Beltrán-Beck et al., 2014a, 2014b) como en estudios de campo (Díez-Delgado et al., 2017, 2018).

Las vacunas de subunidades proteicas (Ag85B/ESAT-6, CFP, Mtb72f) con adyuvantes o ADN de micobacterias, solo o en combinación con ADN codificante de moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86, han sido también empleadas frente a la TB, resultando en una protección parcial en muchos modelos animales (Dey et al., 2009; Tchilian et al., 2009). Estas vacunas recombinantes fueron usadas junto a la BCG como estímulo amplificador de la respuesta, alcanzando en algunos casos cierto nivel de protección (Buddle et al., 2011). Hasta la fecha, no existen estudios que hayan tenido éxito empleando vacunas de subunidades, DNA o vivas con vectores víricos frente a la TB en fauna silvestre.

Características de una vacuna ideal

Una vacuna ideal para ser utilizada en fauna silvestre debería cumplir una serie de requisitos, como tener principalmente eficacia, estabilidad y seguridad, supervivencia y excreción limitadas, ausencia de interferencia con los test diagnósticos, facilidad de administración, y una buena relación coste/efectividad.

Eficacia vacunal

La eficacia de las vacunas frente a la TB se valida a menudo evaluando los niveles de excreción, las lesiones macro/microscópicas, la carga micobacteriana en los tejidos (cultivo y aislamiento, tinción de Ziehl-Neelsen o PCR) o la inducción de una respuesta inmune protectora (mediada por células o anticuerpos), comparando los resultados entre un grupo de animales vacunados y uno control, ambos infectados con una micobacteria perteneciente al MTBC.

La presencia de lesiones macroscópicas compatibles con TB (LTB) se evalúan a través de una necropsia exhaustiva, incluyendo la inspección de todos los órganos relevantes (Vicente et al., 2007b). Normalmente se establece una puntuación detallada de las lesiones para determinar el grado de protección inducido por la vacuna en ensayos de laboratorio (Palmer et al., 2007, 2009; Ballesteros et al., 2009a; Lesellier et al., 2011; Garrido et al., 2011; Beltrán-Beck et al., 2014a; Chambers et al., 2017; Thomas et al., 2017), mientras que en los estudios de campo se emplea la prevalencia total de las lesiones (Nugent et al., 2016; Díez-Delgado et al., 2017, 2018; Gormley et al., 2017). Un sistema de puntuación del cultivo micobacteriano también suele ser utilizado para determinar la carga micobacteriana en los tejidos en los ensayos de vacunación (Garrido et al., 2011; Chambers et al., 2017; Thomas et al., 2017). Los estudios con BCG o con *M. bovis* inactivada por calor (parenteral/oral) redujeron en mayor o menor medida la carga total de la infección y especialmente las LTB torácicas en ciervo, jabalí o tejón inoculados experimentalmente con *M. bovis* (Palmer et al., 2007, 2009; Corner et al., 2010; Lesellier et al., 2011; Beltrán-Beck et al., 2014a; Thomas et al., 2017; Balseiro et al., 2020a) o infectados naturalmente (Díez-Delgado et al., 2017, 2018; Gormley et al., 2017; Aznar et al., 2018). Sin embargo, estas vacunas no confirieron una inmunidad esterilizante.

Con respecto a la estimulación de la respuesta inmunitaria, se ha sugerido que la evaluación de las citoquinas producidas por linfocitos T es un marcador potencial para predecir la eficacia vacunal (McShane, 2009), como en el caso del IFN- γ , y especialmente del ratio de IFN- γ e interleuquina (IL)-10, en la vacunación con BCG y *M. bovis* inactivada por calor (Palmer et al., 2007; Garrido et al., 2011; Thomas et al., 2017). La IL-1 β es una citoquina proinflamatoria considerada como la principal responsable de la producción del componente C3 del complemento en los ensayos de vacunación oral (de la Fuente et al., 2016), donde éste es asociado de forma natural a la eficacia vacunal frente a la TB en jabalí (Beltrán-Beck et al., 2014a) y ciervo (López et al., 2016; Thomas et al., 2017). Los resultados de la inducción de anticuerpos tras una vacunación parenteral son variables, observándose una fuerte respuesta de anticuerpos frente a MPB83 después de la vacunación con *M. bovis* inactivada por calor en jabalí, pero menor frente al derivado proteico purificado de *M. bovis* (PPD bovina) (Garrido et al., 2011). Sin embargo, sí se observa respuesta de anticuerpos frente a PPD bovina y otros antígenos de MTBC tras la vacunación parenteral con BCG en cérvidos (Griffin et al., 1993; Waters et al., 2003; Nol et al., 2009) y tejón (Chambers et al., 2011). En contraste, la administración oral de estas vacunas no induce ninguna respuesta de anticuerpos (Nol et al., 2009; Palmer et al., 2009; Garrido et al., 2011; Beltrán-Beck et al., 2014a; López et al., 2016; Chambers et al., 2017; Thomas et al., 2017).

La dosis y frecuencia de la vacunación es importante para el tipo de respuesta inmunitaria protectora que se establece y para la duración de dicha protección.

Como ejemplo, niveles inferiores de protección fueron observados con dosis muy altas ($\sim 10^9$ UFC), en comparación con dosis medias y bajas, tras la administración parenteral de BCG en ciervos de cola blanca (Griffin et al., 1999). Sin embargo, la dosis óptima de BCG y *M. bovis* inactivada por calor es mayor en el caso de administración oral (10^8 - 10^9 UFC) con respecto a la parenteral (10^5 - 10^6 UFC) en las especies estudiadas (Lesellier et al., 2006; Nol et al., 2008, 2009; Corner et al., 2010; Garrido et al., 2011). En cuanto a la revacunación oral/parenteral con BCG, ésta indujo una mayor respuesta protectora en ciervo y jabalí que la dosis única (Griffin et al., 1999; Palmer et al., 2007; Gortázar et al., 2014). En la administración por vía oral de cebos, la posibilidad de una sobredosis o del consumo de dosis bajas puede afectar a la eficacia de la vacuna, por lo que para evitar esto, existen algunos métodos que mitigan el sobreconsumo de cebos vacunales por un animal dominante, como capturar a los animales en trampas (Gormley et al., 2017; Aznar et al., 2018), distribuir los cebos más esparcidamente o mezclar los cebos de vacuna con cebos placebo (Ballesteros et al., 2010; Buddle et al., 2015; Casades-Martí et al., 2017; Díez-Delgado et al., 2018). No obstante, se ha probado que la protección inducida por el consumo de múltiples cebos es similar a la de un solo cebo oral (Buddle et al., 2006). Por último, otro factor determinante en la evaluación de la eficacia vacunal es el desafío con MTBC, siendo el desafío experimental normalmente más severo que la exposición natural a la micobacteria (Garrido et al., 2011; Beltrán-Beck et al., 2014a; Chambers et al., 2017; Díez-Delgado et al., 2017, 2018, 2019; Gormley et al., 2017), lo que puede llevar a una infravaloración de la protección de la vacuna (Thomas et al., 2017).

Estabilidad y seguridad

La estabilidad de una vacuna es un factor importante para la vacunación con BCG, al ser una cepa viva avirulenta. En este sentido, la estabilidad de la cepa Pasteur fue menor al compararla con la Danesa (Aldwell et al., 2003). La cepa Danesa mostró ser estable durante 3-5 semanas en condiciones de campo en un hábitat tipo bosque o dehesa y durante 7 semanas en una matriz lipídica a temperatura ambiente (21 °C, aproximadamente) (Cross et al., 2009). En condiciones laborales de congelación, la BCG fue estable hasta 8 meses (Cross et al., 2009). Generalmente, las vacunas inactivadas tienen mayor estabilidad porque están muertas (Tzeng et al., 2018), aunque la estabilidad de *M. bovis* inactivada por calor no ha sido aún estudiada en condiciones de campo.

En lo que se refiere a seguridad, la vacunación parenteral con BCG no suele presentar ninguna reacción adversa, salvo abscesos y nódulos en el punto de inoculación o signos clínicos de poca importancia que, por lo general, se resuelven con relativa rapidez (Buddle et al., 2018). En los estudios de fauna silvestre vacunada por vía parenteral con *M. bovis* inactivada no se observaron reacciones

adversas en el lugar de inoculación (Beltrán-Beck et al., 2014c; Díez-Delgado et al., 2019). Ninguna de estas vacunas han mostrado reacciones adversas cuando han sido administradas por vía oral (Murphy et al., 2008; Beltrán-Beck et al., 2014a, 2014c; Thomas et al., 2017).

Supervivencia y excreción limitadas

La BCG ha sido aislada a partir de tejidos de animales vacunados, dependiendo su supervivencia del tiempo post-administración, de la especie animal, de la ruta de administración, así como de la dosis y del tipo de vacuna utilizada. Las cepas Danesa y Pasteur de la BCG han sido recuperadas a partir de ciervos y tejones vacunados oralmente hasta 3 meses después de la vacunación, mientras que persistieron hasta 9 meses en órganos linfáticos de aquellos vacunados subcutáneamente (Palmer et al., 2009, 2010; Balseiro et al., 2020a), no detectándose en carne (Palmer et al., 2010). Sin embargo, la BCG Danesa no fue hallada en tejidos de cerdos silvestres examinados a los 30 días de la vacunación (Nol et al., 2016) o en jabalíes a los 175-300 días post-vacunación (Beltrán-Beck et al., 2014c). Por otro lado, *M. bovis* inactivada por calor, al ser una vacuna muerta, no causa ningún problema de supervivencia (Beltrán-Beck et al., 2014c; Balseiro et al., 2020a).

La excreción o eliminación de BCG al medio podría incrementar la posibilidad de transmisión a otros animales. Se han proporcionado evidencias de la transmisión de BCG desde ciervos de cola blanca, vacunados oral y parenteralmente, a ciervos no vacunados en contacto con ellos (Palmer et al., 2009, 2010; Nol et al., 2013), así como en tejones vacunados oralmente (Wedlock et al., 2005). Sin embargo, la magnitud y duración de la eliminación de BCG en las excreciones fueron limitadas en casi todas las especies estudiadas (Wedlock et al., 2005). Por otro lado, no se observó excreción de BCG en ciervo rojo (Griffin et al., 1993) o jabalí (Beltrán-Beck et al., 2014c; Gortázar et al., 2014) después de la vacunación oral/parenteral. Obviamente, *M. bovis* inactivada por calor no tiene riesgos de excreción o eliminación al medio (Beltrán-Beck et al., 2014c).

Ausencia de interferencia con los test diagnósticos

La IDTB y el ensayo de liberación de IFN- γ (IGRA) son las pruebas diagnósticas utilizadas oficialmente en el Programa nacional de erradicación de la TB bovina (MAPA, 2019a, 2019b), basado en el testaje y sacrificio de los animales positivos a estas técnicas (Directivas 64/432/CEE y 78/52/CEE). Estas pruebas pueden verse alteradas por la vacunación parenteral frente a la TB, comprometiéndose así las estrategias de diagnóstico de los programas oficiales de control y erradicación de la enfermedad. Sin embargo, en la fauna silvestre de vida libre, este hecho no sería tan importante ya que normalmente no se someten a

pruebas de diagnóstico *in vivo*, a excepción de aquellos supuestos que están regulados por el Real Decreto 1082/2009 sobre los requisitos de sanidad animal para el movimiento de animales de explotaciones cinegéticas, de núcleos zoológicos, así como de animales de fauna silvestre (Real Decreto 138/2020). En fauna silvestre, la vacunación parenteral con BCG induce una fuerte respuesta inmune celular y humoral frente a PPD bovina en ciervo (Griffin et al., 1993, 1999, 2006), en ciervo de cola blanca (Nol et al., 2008, 2009; Palmer et al., 2009), en jabalí (Garrido et al., 2011), en tejón (Lesellier et al., 2006, 2011; Chambers et al., 2011) y en otras especies (Waters et al., 2003; Parlane et al., 2014; Nugent et al., 2017). Una respuesta similar fue observada en jabalíes vacunados parenteralmente con *M. bovis* inactivada por calor (Garrido et al., 2011). En cambio, la vacunación oral con BCG y *M. bovis* inactivada no causó ninguna interferencia diagnóstica en las especies testadas (Corner et al., 2010; Garrido et al., 2011; Beltrán-Beck et al., 2014a; Murphy et al., 2014; López et al., 2016; Thomas et al., 2017; Díez-Delgado et al., 2018; Balseiro et al., 2020a). En cuanto a los anticuerpos, la vacunación subcutánea con BCG dió lugar a una alta respuesta frente a lipoarabinomano en ciervos de cola blanca, la cual no se observó frente a CFP-10/ESAT-6 (Palmer et al., 2007).

Facilidad de administración: énfasis en los cebos orales

La administración de una vacuna en la fauna silvestre es un problema importante debido a las dificultades logísticas y técnicas, que incluyen la captura de los animales y el amplio tamaño de la población diana (Fischer et al., 2016). A pesar de que se ha demostrado que en las vacunas frente a la TB la ruta de administración parenteral produce una protección significativamente mayor ante inóculos experimentales e infecciones naturales (Palmer et al., 2009, 2014; Garrido et al., 2011; Díez-Delgado et al., 2018), la administración oral es la opción más conveniente y económica cuando se busca una vacunación a gran escala. Así, en la fauna silvestre, a diferencia del ganado doméstico, los requisitos de una vacuna son que pueda ser autoadministrada por vía oral, que la dosis ingerida se encuentre dentro de los límites de seguridad y que se evite la propagación a otros animales domésticos o silvestres, aunque la protección de los animales vacunados no sea completa.

En la vacunación oral, la BCG debe administrarse viva para generar inmunidad, por lo que se verá afectada por la degradación en el estómago del animal (Buddle et al., 2006). Así, la administración oral de un cultivo líquido de BCG indujo menos protección que cuando fue administrada intraduodenal o intragástricamente después de un tratamiento para reducir la degradación enzimática (Buddle et al., 2006). La inmunización efectiva por vía oral puede lograrse protegiendo la BCG mediante encapsulación en una matriz lipídica

(cebos orales) y utilizando cajas selectivas de alimentación para su reparto (Ballesteros et al., 2009b, 2011). Se han empleado una gran variedad de transportadores para proteger las distintas vacunas en cebos diseñados para la fauna silvestre, tales como cápsulas, bolsitas, ampollas (Knobel et al., 2003) y formulaciones lipídicas (Aldwell et al., 2003), dependiendo de la administración oral, la estabilidad, el hospedador y la Sp según la edad. En todos los casos, un factor importante a tener en cuenta es su atractivo y palatabilidad. Así, los cebos con alfalfa fueron más palatables para el ciervo (Casades-Martí et al., 2017), mientras que en el ciervo de cola blanca fueron empleados los cebos con manzana (Nol et al., 2008) (Figura 71). En cuanto al jabalí, se han usado cebos de galleta de pienso aromatizada con cereales, azúcar y parafina (Ballesteros et al., 2009b, 2011). En tejones, los cebos suelen incluir a su vez una base de manteca de cacahuete.



Figura 71. Ejemplos de cebos utilizados para vacunar de tuberculosis a ungulados silvestres. A) Cebos de galleta de pienso aromatizada (flecha negra), de melaza (flecha gris) y alfalfa (flecha blanca) para la vacunación de fauna silvestre. B) Jabalí adulto y rayones comiendo pienso y cebos. C) Ciervos comiendo pienso y cebos.

La administración de la BCG en cebos fue efectiva en ensayos laboratoriales con ciervos de cola blanca (Nol et al., 2008, 2009). Este tipo de administración también fue efectiva en ensayos experimentales y de campo en jabalíes vacunados con BCG (Ballesteros et al., 2009b; Gortázar et al., 2014; Díez-Delgado et al., 2018) y *M. bovis* inactivada por calor (Beltrán-Beck et al., 2014a; Díez-Delgado et al., 2018), así como en tejonos vacunados con BCG (Corner et al., 2010; Murphy et al., 2014; Chambers et al., 2017; Gormley et al., 2017; Aznar et al., 2018). Sin embargo, existe el riesgo de que los cebos orales que contienen BCG para la vida silvestre puedan ser ingeridos por el ganado, lo que podría resultar en una posterior respuesta positiva a la IDTB, por lo que es esencial tener especial cuidado con la distribución de dichos cebos (Sorensen et al., 2014).

Perspectivas futuras

Actualmente, la vacunación frente a la TB está prohibida para el ganado bovino en la UE (Directiva 78/52/CEE), por su incompatibilidad con las pruebas de diagnóstico oficiales para la calificación de las explotaciones (Directiva 64/432/CEE). Sin embargo, la vacunación en animales que no están sometidos a los programas oficiales de erradicación de la TB, como la fauna silvestre, se percibe como una alternativa en zonas con alta prevalencia para el control de la enfermedad. En estas áreas se ha evidenciado que el contacto entre diferentes especies domésticas criadas en sistemas extensivos y los reservorios silvestres de MTBC favorece la circulación y el mantenimiento de micobacterias en el medio (Bailey et al., 2013; Cowie et al., 2016).

Por todo ello, ha crecido el interés en el desarrollo y uso de vacunas contra la TB en la fauna silvestre, la cual también se ha visto favorecida por una mejor comprensión de la respuesta inmunitaria frente a la enfermedad, el desarrollo de pruebas DIVA y la mayor inversión en el desarrollo de vacunas para humanos y animales domésticos. Como ya se ha comentado, los ensayos experimentales de vacunación frente a la TB en fauna silvestre han aumentado considerablemente en los últimos tiempos, obteniéndose resultados de eficacia vacunal muy interesantes. Sin embargo, la protección inducida por las vacunas frente a la enfermedad podría disminuir con el paso del tiempo, siendo importante mantener dicha protección mediante la revacunación.

Entonces, ¿por qué no se aplican ya vacunas para control de TB en fauna silvestre española? Responder a esta pregunta llevaría varias páginas. Resumiendo, porque no existe la vacuna perfecta (siempre necesitará otras actuaciones paralelas), porque vacunar fauna resulta caro si se pretende una buena tasa de vacunación, y porque existen dificultades para poder cumplir con la compleja normativa relacionadas con la consideración, o no, de *M. bovis* inactivado por calor como

medicamento. Una alternativa a explorar para soveltar estas dificultades sería la posibilidad de su utilización en forma de autovacuna de acuerdo con la legislación aplicable y su elaboración en centros específicamente autorizados siguiendo un Procedimiento Normalizado de Trabajo.

En todo caso, la vacunación no debe implementarse de forma aislada, sino que debe estar incluida en un plan de lucha integrada frente a la TB, donde también se incluyan otras medidas como la mejora de la bioseguridad en las fincas, para evitar o disminuir el contacto entre animales domésticos y silvestres, o el control poblacional de la fauna silvestre, para evitar sobreabundancias que puedan favorecer el mantenimiento de la enfermedad.

5

Reflexiones finales

José Luis Sáez, Marta Muñoz, Christian Gortázar,
Ana Balseiro



Tras los descubrimientos de Koch, Calmette y Guérin y otros investigadores de finales del siglo XIX y principios de siglo XX se iniciaron, a partir de 1930, esquemas de control de la TB animal en el ganado bovino cuyas esencias permanecen prácticamente inalteradas bien avanzado el siglo XXI. Desafortunadamente, un siglo más tarde la TB animal continúa estando de plena actualidad.

En España, el Programa nacional de erradicación tuvo plena implantación territorial a partir de mediados de los 90 del siglo pasado y desde entonces, anualmente, es actualizado, conforme a la evolución de la enfermedad y a los avances científicos. La enfermedad continúa siendo una preocupación para la salud pública y la sanidad animal, de forma que las principales agencias internacionales relacionadas han elaborado, como ya se ha mencionado en varios capítulos, una "Hoja de Ruta" para la erradicación de la TB zoonótica, bajo el concepto de "One Health".

De 2009 a 2018 se duplicó la prevalencia de TB en rebaños de ganado bovino de la UE, a pesar de una inversión sustancial para su erradicación. Entre otras causas, este incremento ha sido atribuido a las debilidades de las pruebas de diagnóstico y al mantenimiento de la infección en la propia cabaña bovina, así como al papel de los hospedadores de mantenimiento no bovinos, tanto domésticos como silvestres.

El impacto económico de las campañas de saneamiento es innegable, en ambos sentidos. Por una parte, los productores consideran que el coste de producción de los animales dedicados a la reproducción en una explotación de ganado bovino, unidos al coste de oportunidad que supone su pérdida no programada, supera las compensaciones recibidas de la administración y el valor de la carne. Por otra parte, un aumento descontrolado de la TB bovina pondría en peligro el comercio y la exportación, con efectos dramáticos sobre el mercado.

En este libro ha quedado patente que, como principales avances científicos que actúan como herramientas complementarias de los programas de vigilancia,

control o erradicación de la TB animal, se encuentran las pruebas de caracterización molecular, que proporcionan un poder de discriminación creciente para realizar investigaciones epidemiológicas de los casos. Una vez realizada la plena implantación de la WGS se culminará este proceso.

Igualmente se han constituido en herramientas imprescindibles los modelos de transmisión adaptados a la situación española, tanto basados en la fórmula de Reed-Frost como compartimentados, que han inspirado buena parte de las adaptaciones realizadas en los programas nacionales anuales de erradicación de la TB. Así, se han determinado parámetros básicos, de plena actualidad por la irrupción del virus SARS-CoV-2 en el mundo, como son el número reproductivo básico R_0 , la tasa de transmisión β y la duración media de los periodos de latencia, oculto y reactor. Mediante la utilización de simulaciones matemáticas se obtiene información de enorme utilidad para planificar, por ejemplo, la frecuencia de las pruebas en función de la prevalencia de la enfermedad.

Una asignatura aún pendiente es la realización de las encuestas epidemiológicas por profesionales específicamente formados para tal fin y siguiendo una metodología común. Alcanzar dicho objetivo será un importante apoyo para el Programa de erradicación, pues éste se actualiza con medidas encaminadas a combatir las vías más probables de entrada de la infección, a partir de los principales factores de riesgo identificados en las encuestas epidemiológicas realizadas a los nuevos rebaños infectados. Asimismo, los estudios sociológicos identificarán perfiles de opinión o actitudes hacia el programa de erradicación, lo que complementará el conocimiento de las causas que pudiesen suponer un obstáculo para el avance de éste.

Pruebas de diagnóstico y el reservorio bovino

En lo que a epidemiología se refiere, el ganado bovino continúa representando un reservorio importante, más por su naturaleza que por su número. Un aspecto frecuentemente debatido de los programas de erradicación es la Se y Sp de las pruebas. La prueba IDTB, que continúa utilizándose como diagnóstico de rutina de esta enfermedad, cuenta hoy en día con una estandarización de procedimientos y reactivos (las PPDs o tuberculinas), que tiene como finalidad maximizar su capacidad diagnóstica. Como alternativa a ser considerada prueba de rutina, y hasta ahora considerada como prueba complementaria a la IDTB para incrementar la Se global del diagnóstico, debe ser tenida en cuenta la prueba IGRA. No obstante, existen aún cuestiones pendientes de solventar para poder extender su uso. Entre ellas, destacan la limitación de tiempo entre la toma de muestras y la estimulación de la sangre en el laboratorio, o la armonización y estandarización de los protocolos.

Por su parte, las pruebas basadas en la respuesta inmune humoral (detección de anticuerpos) han emergido como una herramienta adicional para mejorar la capacidad de identificar animales infectados o enfermos a partir de la detección de anticuerpos mediante el uso de distintos antígenos. Destaca el complejo multiproteico P22, en torno al que se siguen realizando los estudios necesarios para su validación y autorización. En algunas especies, sobre todo silvestres, las pruebas serológicas se postulan como las técnicas rutinarias de elección, ya que aportan notables ventajas, como un menor manejo de los animales y la posibilidad de uso tanto *ante mortem* como *post mortem*.

Finalmente, la detección de lesiones en matadero juega un papel clave en los programas de erradicación, aunque también es susceptible de mejorar. Por ejemplo, el diagnóstico anatomopatológico inicial ayuda a descartar o confirmar de forma relativamente rápida la sospecha y proporciona, además, diagnósticos alternativos muy valiosos. En Estados Unidos, por ejemplo, se incentiva la remisión de muestras sospechosas desde los mataderos a fin de aumentar la detección. Asimismo, próximamente estarán disponibles protocolos armonizados y validados para la realización de PCR sobre tejidos a partir de muestras de matadero, con una elevada Se y Sp. Esto posibilitará el acortamiento del tiempo de respuesta del laboratorio, lo que permitirá realizar actuaciones más inmediatas sobre los animales o las explotaciones bajo sospecha.

Los grupos de investigación también están centrando sus esfuerzos en el estudio de la presencia del MTBC en el medio ambiente y en su posible papel en la epidemiología de la TB animal. Por otra parte, el estudio e identificación de otras micobacterias ambientales o atípicas puede ayudar a discriminarlas y prevenirlas en territorios próximos a la erradicación, en explotaciones con una evaluación de riesgo favorable y allí donde se detecten animales reaccionantes en los que, tras su sacrificio, se cultiven dichas micobacterias ambientales.

Hospedadores no bovinos

En la Península Ibérica el número estimado de hospedadores no bovinos infectados (domésticos y silvestres) es muchas veces mayor al de bovinos infectados. Esto determina la necesidad de continuar adaptando las estrategias para un control más efectivo de la TB animal.

Entre los hospedadores domésticos no bovinos, sólo la especie caprina está incluida en las actuaciones del Programa nacional de erradicación, y exclusivamente cuando conviven o tienen relación epidemiológica con bovinos infectados. Además, existen programas de erradicación a nivel autonómico. El control en esta especie sería más eficaz si existiese un programa nacional de erradicación específico para tal fin. No obstante, se está avanzando en otras posibles medidas

de control como la vacunación. En cuanto a los ovinos, cuando comparten instalaciones o cohabitan estrechamente con ganado bovino o caprino infectado de TB, deberían tenerse en cuenta como fuentes potenciales de infección residual para esos rebaños y deberían analizarse para comprobar su estado. En los últimos años, también se viene evidenciando la presencia de TB en el porcino extensivo. Afortunadamente, las pruebas de diagnóstico serológico resultan de especial utilidad en esta especie.

Durante mucho tiempo se pensó que la transmisión de micobacterias del MTBC se producía exclusivamente por vía aerógena y de forma directa, pero recientemente se ha observado que la vía digestiva también juega un papel importante en su transmisión, sobre todo indirecta, por la capacidad de permanencia de la micobacteria viable en pastos, alimentos, agua o barro, entre otros. Este es el mecanismo más probable para la transmisión bidireccional de la infección entre el ganado doméstico y la fauna silvestre.

Existen múltiples evidencias científicas que señalan al jabalí, ciervo, gamo y tejón como fuentes de infección o reinfección para el ganado, especialmente en el cuadrante suroccidental de la Península Ibérica en el caso de los ungulados y, en la España atlántica en el caso del tejón. La gestión de fauna silvestre difiere del manejo ganadero en que, por regla general, no existe la posibilidad de aplicar técnicas diagnósticas de prueba y eliminación, ni hay marcaje individual, y muchas veces ni tan siquiera un propietario o responsable de los animales silvestres. En consecuencia, mientras no sea posible recurrir a la vacunación, las opciones de control sanitario en la interfaz fauna-ganado se reducen a la gestión cinegética sensata, a la vigilancia pasiva y activa y a la implementación de medidas de bioseguridad.

Nuevas vías para controlar la tuberculosis

Afortunadamente, los sistemas de gestión de la ganadería y de la fauna silvestre pueden ser manipulados para fortalecer la bioseguridad y disminuir los contactos directos e indirectos entre especies, reduciendo así la transmisión interespecífica del MTBC. Así lo dispone el recién aprobado Real Decreto 138/2020, de 28 de enero, que a su vez deriva del PATUBES (MAPA, 2017). Las posibles actuaciones para la mejora de la bioseguridad afectan a la gestión de la fauna; a la gestión del agua, del alimento y de la suplementación mineral; a la gestión del pastoreo y del rebaño; a actuaciones sobre otras especies domésticas; así como a la gestión de residuos. Los casos de éxito de algunos programas de mejora de la bioseguridad ya puestos en marcha, como el de COVAP en el sur de España o el de Andía en Navarra, indican que éste es uno de los caminos a seguir en la lucha contra la TB.

La normativa nacional ha recogido además buena parte de las posibles actuaciones preventivas para el control sanitario en especies cinegéticas: el control en los traslados, la gestión de los residuos de caza, el control poblacional, la regulación del manejo del agua o del alimento, etc. Ha llegado el momento de su aplicación efectiva y de abordar cuestiones pendientes como la utilización de cepas inactivadas como vacunas, autovacunas u otras fórmulas que se puedan encuadrar en la legislación vigente.

La vacunación de animales domésticos y silvestres es una herramienta que deberá ser utilizada en el futuro dentro del sistema integrado de medidas de control frente a la TB. Actualmente, se prohíbe la vacunación a nivel europeo en ganado bovino, principalmente porque cuando se utiliza BCG la vacunación interfiere con las pruebas de diagnóstico oficiales y porque no existen a día de hoy técnicas de diagnóstico que permitan diferenciar los animales vacunados de los infectados (técnicas DIVA). Sin embargo, excluyendo al ganado bovino, prototipos como la vacuna basada en *M. bovis* inactivada por calor podrían tener muchas ventajas, a la vista de los resultados de eficacia obtenidos en diferentes especies domésticas y silvestres, y dada la mínima interferencia que produce esta vacuna en las pruebas de diagnóstico. Su uso por vía parenteral en ganado caprino y ovino podría estar justificado en áreas de alta prevalencia de TB animal, donde no se lleven a cabo otros programas de control y erradicación. Así mismo, los beneficios de su uso mediante cebos en animales silvestres como jabalí y tejón son evidentes, siempre que esté justificado por la presencia de una alta tasa de infección. Sin embargo, no hay que olvidar que la TB es una enfermedad compleja, que no se resolverá con el empleo de una única medida de control sobre una única especie. Tenemos que ser conscientes de que es necesario trabajar en equipo (servicio veterinario oficial, veterinarios privados, empresas, ganaderos, cazadores...) y utilizar en paralelo todas las herramientas disponibles a nuestro alcance: diagnósticas, vacunas, encuestas epidemiológicas, etc. Solo así conseguiremos minimizar y controlar esta enfermedad.

Mucho por hacer

Con este libro hemos querido recordar el camino recorrido desde el descubrimiento del patógeno causante de la TB hasta la actualidad, destacando los principales avances científicos realizados en el último lustro. España se encuentra a la cabeza de la investigación mundial de esta enfermedad, entre otras razones, porque las personas que trabajamos en ello creemos que solo a través del avance del conocimiento y la tecnología lograremos avanzar en el control de la TB. Pero aún queda mucho camino por recorrer y se requerirán nuevas inversiones y reforzar las existentes en investigación y desarrollo.

La crisis derivada de la emergencia de la COVID viene a añadir incertidumbres sobre el actual nivel de financiación existente para los programas sanitarios, que en España siempre han sido priorizados; pero puede suponer también una oportunidad, procurando un máximo aprovechamiento de nuestros recursos y capacidades. Pero sobre todo los ganaderos y, en menor medida, los cazadores, tendrán que poner mucho de su parte, ya sea en forma de un desvieje más temprano de los animales o renunciando al aporte de alimento a la caza en terrenos abiertos, respectivamente.

Los editores de este libro queremos dar las gracias, por su compromiso con esta causa, a todos los servicios veterinarios oficiales y privados, investigadores, así como al sector ganadero y demás actores que trabajan día a día con la visión de un futuro sin TB.

Agradecimientos



Especial agradecimiento al proyecto financiado por el Gobierno del Principado de Asturias, referencia PCTI 2018–2020 (GRUPIN: IDI2018-000237, SERIDA) cofinanciado con fondos FEDER por asumir los costes de maquetación, al Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) del Gobierno de España por asumir los costes de de impresión y a Claudia Bevilacqua por colaborar en la edición de las referencias bibliográficas.

Referencias bibliográficas



- Aaby, P., Andersen, A., Ravn, H., Zaman, K., 2017. Co-administration of BCG and diphtheria-tetanus-pertussis (DTP) vaccinations may reduce infant mortality more than the WHO-schedule of BCG first and then DTP. A re-analysis of demographic surveillance data from rural Bangladesh. *EBioMedicine* 22, 173-180.
- Aagaard, C., Govaerts, M., Meikle, V., Gutiérrez-Pabello, J.A., McNair, J., Andersen, P., Suárez-Güemes, F., Pollock, J., Espitia, C., Cataldi, A., 2010. Detection of bovine tuberculosis in herds with different disease prevalence and influence of paratuberculosis infection on PPDB and ESAT-6/CFP10 specificity. *Preventive Veterinary Medicine* 96, 161-169.
- 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, 37-47.
- Acevedo, P., Ferreres, J., Jaroso, R., Durán, M., Escudero, M.A., Marco, J., Gortázar, C., 2010. Estimating roe deer abundance from pellet group counts in Spain: An assessment of methods suitable for Mediterranean woodlands. *Ecological Indicators* 10, 1226-1230.
- Acevedo, P., Farfán, M.Á., Márquez, A.L., Delibes-Mateos, M., Real, R., Vargas, J.M., 2011. Past, present and future of wild ungulates in relation to changes in land use. *Landscape Ecology* 26, 19-31.
- Acevedo, P., González-Quirós, P., Etherington, T.R., Prieto, J.M., 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.
- Acevedo, P., Prieto, M., Quirós, P., Merediz, I., de Juan, L., Infantes-Lorenzo, J., Triguero-Ocaña, R., Balseiro, A., 2019. Tuberculosis epidemiology and badger spatial ecology in a hot-spot area from Atlantic Spain. *Pathogens* 8, 292.
- Acosta, B., Real, F., Leon, L., Deniz, S., Ferrer, O., Rosario, I., Ramírez, A., 2000. ELISA for anti-MPB70: an option for the diagnosis of goat tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*. *Australian Veterinary Journal* 78, 423-424.
- Adams, J.S., Hewison, M., 2010. Update in vitamin D. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 95, 471-478.
- Adams, A.P., Bolin, S.R., Fine, A.E., Bolin, C.A., Kaneene, J.B., 2013. Comparison of PCR versus culture for detection of *Mycobacterium bovis* after experimental inoculation of

- various matrices held under environmental conditions for extended periods. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 6501-6506.
- Aguilo, N., Gonzalo-Asensio, J., Álvarez-Arguedas, S., Marínova, D., Gómez, A.B., Uranga, S., Spallek, R., Singh, M., Audran, R., Spertini, F., Martín, C., 2017. Reactogenicity to major tuberculosis antigens absent in BCG is linked to improved protection against *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Communications* 8, 16085.
- Albert, H., Heydenrych, A., Brookes, R., Mole, R.J., Harley, B., Subotsky, E., Henry, R., Azevedo, V., 2002. Performance of a rapid phage-based test, FASTPlaqueTB, to diagnose pulmonary tuberculosis from sputum specimens in South Africa. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 6, 529-537.
- Albert, H., Trollip, A., Seaman, T., Mole, R.J., 2004. Simple, phage-based (FASTPplaque) technology to determine rifampicin resistance of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 8, 1114-1119.
- Albrecht, W.A., 1958. *Soil Fertility and Animal Health*. First Edn. Fred Hahne Printing Company, Webster City, Iowa.
- Aldwell, F.E., Keen, D.L., Parlane, N.A., Skinner, M.A., de Lisle, G.W., Buddle, B.M., 2003. Oral vaccination with *Mycobacterium bovis* BCG in a lipid formulation induces resistance to pulmonary tuberculosis in brushtail possums. *Vaccine* 22, 70-76.
- Alfayate, S., Piñero, J., Montero, M.T., Mula, J.A., Paredes, P., Zaráuz, J.M., 2009. Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in Murcia. *Anales de Pediatría* 71, 327-330.
- Algammal, A.M., Wahdan, A., Elhaig, M.M., 2019. Potential efficiency of conventional and advanced approaches used to detect *Mycobacterium bovis* in cattle. *Microbial Pathogenesis* 134, 103574.
- Allix-Beguec, C., Harmsen, D., Weniger, T., Supply, P., Niemann, S., 2008. Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *Journal of Clinical Microbiology* 46, 2692-2699.
- Allix, C., Walravens, K., Saegerman, C., Godfroid, J., Supply, P., Fauville-Dufaux, M., 2006. Evaluation of the epidemiological relevance of variable-number tandem-repeat genotyping of *Mycobacterium bovis* and comparison of the method with IS6110 restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping. *Journal of Clinical Microbiology* 44, 1951-1962.
- 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. *The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 30, 468-470.
- Alonso-Hearn, M., Molina, E., Geijo, M., Vázquez, P., Sevilla, I.A., Garrido, J.M., Juste, R.A., 2012. Immunization of adult dairy cattle with a new heat-killed vaccine is associated with longer productive life prior to cows being sent to slaughter with suspected paratuberculosis. *Journal of Dairy Science* 95, 618-629.
- Altet Gómez, N., 2009. Micobacterias no tuberculosas: ¿una infección emergente?. *Anales de Pediatría* 71, 185-188.
- Altet, N., Domínguez, J., de Souza-Galvão, M.L., Jiménez-Fuentes, M.Á., Milà, C., Solsona, J., Soriano-Arandés, A., Latorre, I., Lara, E., Cantos, A., Ferrer, M.D., Orcau, À., Ruiz-Manzano, J., Caylà, J., 2015. Predicting the development of tuberculosis with the

- tuberculin skin test and quantiFERON testing. *annals of the american thoracic society* 12, 680-688.
- Álvarez, J., de Juan, L., Bezos, J., Aranaz, A., Romero, B., Díez de Tejada, P., Fernández, J.M., Mateos, A., Domínguez, L., 2005. Control strategies in a caprine herd with mixed tuberculosis-paratuberculosis infection. En: Nielsen SS (Ed.), *Proceedings of the Eighth International Colloquium on Paratuberculosis*. Copenhagen, Denmark. International Association for Paratuberculosis Inc., Madison, Wisconsin, pp. 47.
- Álvarez, J., de Juan, L., Bezos, J., Romero, B., Sáez, J.L., Reviriego-Gordejo, F.J., Briones, V., Moreno, M.A., Mateos, A., Domínguez, L., Aranaz, A., 2008. Interference of paratuberculosis with the diagnosis of tuberculosis in a goat flock with a natural mixed infection. *Veterinary Microbiology* 128, 72-80.
- Álvarez, J., de Juan, L., Bezos, J., Romero, B., Sáez, J.L., Marqués, S., Domínguez, C., Mínguez, O., Fernández-Mardomingo, B., Mateos, A., Domínguez, L., Aranaz, A., 2009. Effect of paratuberculosis on the diagnosis of bovine tuberculosis in a cattle herd with a mixed infection using interferon-gamma detection assay. *Veterinary Microbiology* 135, 389-393.
- Álvarez, J., Castellanos, E., Romero, B., Aranaz, A., Bezos, J., Rodríguez, S., Mateos, A., Domínguez, L., de Juan, L., 2011. Epidemiological investigation of a *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* outbreak in swine. *Epidemiology and Infection* 139, 143-148.
- Álvarez, J., Pérez, A., Bezos, J., Marqués, S., Grau, A., Sáez, J.L., Mínguez, O., de Juan, L., Domínguez, L., 2012a. Evaluation of the sensitivity and specificity of bovine tuberculosis diagnostic tests in naturally infected cattle herds using a Bayesian approach. *Veterinary Microbiology* 155, 38-43.
- Álvarez, J., Pérez, A.M., Bezos, J., Casal, C., Romero, B., Rodríguez-Campos, S., Sáez-Llorente, J.L., Díaz, R., Carpintero, J., de Juan, L., Domínguez, L., 2012b. Eradication of bovine tuberculosis at a herd-level in Madrid, Spain: study of within-herd transmission dynamics over a 12-year period. *BMC Veterinary Research* 8, 100.
- Álvarez, J., Bezos, J., de la Cruz, M.L., Casal, C., Romero, B., Domínguez, L., de Juan, L., Pérez, A., 2014a. Bovine tuberculosis: within-herd transmission models to support and direct the decision-making process. *Research in Veterinary Science* 97, (Suppl. S61-68).
- Álvarez, J., Pérez, A., Marqués, S., Bezos, J., Grau, A., de la Cruz, M.L., Romero, B., Sáez, J.L., del Rosario-Esquivel, M., Martínez-Mdel, C., Mínguez, O., de Juan, L., Domínguez, L., 2014b. Risk factors associated with negative in-vivo diagnostic results in bovine tuberculosis-infected cattle in Spain. *BMC Veterinary Research* 10, 14.
- Ameni, G., Aseffa, A., Sirak, A., Engers, H., Young, D.B., Hewinson, R.G., Vordermeier, M.H., Gordon, S.V., 2007. Effect of skin testing and segregation on the prevalence of bovine tuberculosis, and molecular typing of *Mycobacterium bovis*, in Ethiopia. *Veterinary Record* 161, 782-786.
- Ameni, G., Vordermeier, M., Aseffa, A., Young, D.B., Hewinson, R.G., 2010. Field evaluation of the efficacy of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin against bovine tuberculosis in neonatal calves in Ethiopia. *Clinical and Vaccine Immunology* 17, 1533-1538.
- 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, 96-104.

- Andersen, P., Munk, M.E., Pollock, J.M., Doherty, T.M., 2000. Specific immune-based diagnosis of tuberculosis. *The Lancet. Infectious Diseases* 356, 1099-104.
- Anderson, R.M., May, R.M., 1991. Infectious diseases of humans: dynamics and control. En: HEPATOLOGY. Oxford University Press, Oxford, pp. 757.
- Angkawanish, T., Morar, D., van Kooten, P., Bontekoning, I., Schreuder, J., Maas, M., Wajjwalku, W., Sirimalaisuwan, A., Michel, A., Tijhaar, E., Rutten, V., 2013. The elephant interferon gamma assay: a contribution to diagnosis of tuberculosis in elephants. *Transboundary and Emerging Diseases* 60, 53-59.
- Antognoli, M.C., Remmenga, M.D., Bengtson, S.D., Clark, H.J., Orloski, K.A., Gustafson, L.L., Scott, A.E., 2011. Analysis of the diagnostic accuracy of the gamma interferon assay for detection of bovine tuberculosis in U.S. herds. *Preventive Veterinary Medicine* 101, 35-41.
- Apollonio, M., Andersen, R., Putman, R., 2010. European ungulates and their management in the 21st century. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 618.
- Aranaz, A., Liébana, E., Mateos, A., Domínguez, L., Vidal, D., Domingo, M., González-Llamazares, O., Rodríguez-Ferri, E., Bunschotten, A., van Embden, J.D.A., Cousins, D.V., 1996. Spacer oligonucleotide typing of *Mycobacterium bovis* strains from cattle and other animals: a tool for studying epidemiology of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* 34, 2734-2740.
- Aranaz, A., Liébana, E., Gómez-Mampaso, E., Galan, J.C., Cousins, D., Ortega, A., Blázquez, J., Baquero, F., Mateos, A., Suárez, G., Domínguez, L., 1999. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. nov.: a taxonomic study of a new member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. *International Journal of Systematic Bacteriology* 49, 263-1273.
- Aranaz, A., del Río, R., Ruiz, J., Liébana, E., Montero, N., de Juan, L., Vela, A.I., Mateos, A., Domínguez, L., 2000. Effect of the paratuberculosis vaccine on the IFN-g test for tuberculosis in goats. En: Hewinson G (Ed.), Book of Abstracts of the Third International Conference on *Mycobacterium bovis*, Cambridge, UK. AHVLA, Addlestone, UK, pp. 11.
- Aranaz, A., de Juan, L., Montero, N., Sánchez, C., Galka, M., Delso, C., Álvarez, J., Romero, B., Bezos, J., Vela, A.I., Briones, V., Mateos, A., Domínguez, L., 2004. Bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in wildlife in Spain. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 2602-2608.
- Aranaz, A., de Juan, L., Bezos, J., Álvarez, J., Romero, B., Lozano, F., Paramio, J.L., López-Sánchez, J., Mateos, A., Domínguez, L., 2006. Assessment of diagnostic tools for eradication of bovine tuberculosis in cattle co-infected with *Mycobacterium bovis* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary Research* 37, 593-606.
- Aranow, C., 2011. Vitamin D and the immune system. *Journal of Investigative Medicine* 59, 244-263.
- Araújo, L.S., Mello, F.C., Silva-Nde, B., Leung, J.A., Machado, S.M., Sardella, I.G., Maciel-Rde, M., Saad, M.H., 2014a. Evaluation of gamma interferon immune response elicited by the newly constructed PstS-1(285-374):CFP10 fusion protein to detect *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clinical and Vaccine Immunology* 21, 552-560.
- Araújo, C.P., Osório, A.L.A.R., Jorge, K.S.G., Ramos, C.A.N., Filho, A.F.S., Vidal, C.E.S., Roxo, E., Nishibe, C., Almeida, N.F., Júnior, A.A.F., Silva, M.R., Neto, J.D.B., Cerqueira, V.D., Zumárraga, M.J., Araújo, F.R., 2014b. Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine and bubaline tissues using nested-PCR for TbD1. *PLoS One* 9, e91023.

- Araújo, C.P., Osório, A.L.A.R., Jorge, K.S.G., Ramos, C.A.N., Filho, A.F.S., Vidal, C.E.S., Vargas, A.P.C., Roxo, E., Rocha, A.S., Suffys, P.N., Júnior, A.A.F., Silva, M.R., Neto, J.D.B., Cerqueira, V.D., Araújo, F.R., 2014c. Direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in bovine and bubaline tissues through nested-PCR. *Brazilian Journal of Microbiology* 45, 633-640.
- Arentz, M., Hawn, T.R., 2007. Tuberculosis infection: Insight from immunogenomics. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms* 4, 231-236.
- 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, e0196948.
- Aurtenetxe, O., Barral, M., Vicente, J., de la Fuente, J., Gortázar, C., Juste, R.A., 2008. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies against *Mycobacterium bovis* in European wild boar. *BMC Veterinary Research* 4, 43.
- Ayele, W.Y., Neill, S.D., Zinsstag, J., Weiss, M.G., Pavlik, I., 2004. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 8, 924-937.
- Azimi, T., Mosadegh, M., Nasiri, M.J., Sabour, S., Karimaei, S., Nasser, A., 2019. Phage therapy as a renewed therapeutic approach to mycobacterial infections: a comprehensive review. *Infection and Drug Resistance* 12, 2943-2959.
- Aznar, I., Frankena, K., More, S.J., Whelan, C., Martín, W., Gormley, E., Corner, L.A., Murphy, D., de Jong, M.C., 2014. Optimising and evaluating the characteristics of a multiple antigen ELISA for detection of *Mycobacterium bovis* infection in a badger vaccine field trial. *PLoS One* 9, e100139.
- Aznar, I., Frankena, K., More, S.J., O'Keeffe, J., McGrath, G., de Jong, M.C.M., 2018. Quantification of *Mycobacterium bovis* transmission in a badger vaccine field trial. *Preventive Veterinary Medicine* 149, 29-37.
- Babybekov, S.Z., Bazarbayev, M.B., Yespembetov, B.A., Mussaeva, A., Kanatbayev, S.G., Romashev, K.M., Dossanova, A.K., Yelekeyev, T.A., Akmatova, E., Syrym, N., 2018. Diagnostics of tuberculosis and differentiation of nonspecific tuberculin reactions in animals. *Brazilian Journal of Microbiology* 49, 329-335.
- Bailey, S.S., Crawshaw, T.R., Smith, N.H., Palgrave, C.J., 2013. *Mycobacterium bovis* infection in domestic pigs in Great Britain. *The Veterinary Journal* 198, 391-397.
- Baker, K.H., Gray, H.W.I., Ramovs, V., Mertzanidou, D., Pekşen, Ç.A., Bilgin, C.C., Sykes, N., Hoelzel, A.R., 2017. Strong population structure in a species manipulated by humans since the Neolithic: the European fallow deer (*Dama dama dama*). *Heredity* 119, 16-26.
- Ballesteros, C., Garrido, J.M., Vicente, J., Romero, B., Galindo, R.C., Minguijón, E., Villar, M., Martín-Hernando, M.P., Sevilla, I., Juste, R., Aranaz, A., de la Fuente, J., Gortázar, C., 2009a. First data on Eurasian wild boar response to oral immunization with BCG and challenge with a *Mycobacterium bovis* field strain. *Vaccine* 27, 6662-6668.
- Ballesteros, C., Gortázar, C., Canales, M., Vicente, J., Lasagna, A., Gamarra, J.A., Carrasco-García, R., De la Fuente, J., 2009b. Evaluation of baits for oral vaccination of European wild boar piglets. *Research in Veterinary Science* 86, 388-393.
- Ballesteros, C., Camarero, P.R., Cristòfol, C., Vicente, J., Gortázar, C., De la Fuente, J., Mateo, R., 2010. Analysis by LC/ESI-MS of iophenoxic acid derivatives and evaluation as

- markers of oral baits to deliver pharmaceuticals to wildlife. *Journal of Chromatography B* 878, 1997-2002.
- Ballesteros, C., Vicente, J., Carrasco-García, R., Mateo, R., de la Fuente, J., Gortázar, C., 2011. Specificity and success of oral-bait delivery to Eurasian wild boar in Mediterranean woodland habitats. *European Journal of Wildlife Research* 57, 749-757.
- Balseiro, A., Oleaga, A., Orusa, R., Robetto, S., Domenis, L., Zoppi, S., Dondo, A., Gorla, M., Marín, J.G., Domeni, L., 2009. Tuberculosis in roe deer from Spain and Italy. *Veterinary Record* 164, 468-470.
- Balseiro, A., Rodríguez, O., González-Quirós, P., Merediz, I., Sevilla, I.A., Davé, D., Dalley, D.J., Lesellier, S., Chambers, M.A., Bezos, J., 2011. Infection of Eurasian badgers (*Meles meles*) with *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium* complex in Spain. *The Veterinary Journal* 190, 21-25.
- Balseiro, A., González-Quirós, P., Rodríguez, O., Copano, M.F., Merediz, I., de Juan, L., Chambers, M.A., Delahay, R.J., Marreros, N., Royo, L.J., Bezos, J., Prieto, J.M., Gortázar, C., 2013. Spatial relationships between Eurasian badgers (*Meles meles*) and infected cattle with *Mycobacterium bovis* in Northern Spain. *The Veterinary Journal* 197, 739-745.
- 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, e0180546.
- Balseiro, A., Oleaga, Á., Morales, L.M.Á., Quirós, P.G., Gortázar, C., Prieto, J.M., 2019a. Effectiveness of a calf-selective feeder in preventing wild boar access. *European Journal of Wildlife Research* 65, 38.
- Balseiro, A., Pérez, V., Juste, R.A., 2019b. Chronic regional intestinal inflammatory disease: A trans-species slow infection? *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 62, 88-100.
- Balseiro, A., Prieto J.M., Álvarez, V., Lesellier, S., Davé, D., Salguero, F.J., Sevilla, I.A., Infantes-Lorenzo, J.A., Garrido, J.M., Adriaensen, H., Juste, R.A., Barral, M., 2020a. Protective effect of oral BCG and inactivated *Mycobacterium bovis* vaccines in European badgers (*Meles meles*) experimentally infected with *M. bovis*. *Frontiers in Veterinary Science* 7, 41.
- Balseiro, A., Thomas, J., Gortázar, C., Risalde, M.A., 2020b. Development and challenges in animal tuberculosis vaccination. *Pathogens* 9, 472.
- Barandiaran, S., Pérez-Aguirreburualde, M.S., Marfil, M.J., Martínez-Vivot, M., Aznar, N., Zumárraga, M., Pérez, A.M., 2019. Bayesian assessment of the accuracy of a PCR-based rapid diagnostic test for bovine tuberculosis in swine. *Frontiers in Veterinary Science* 6, 204.
- 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, 42-50.
- Barasona, J.A., Mulero-Pázmány, M., Acevedo, P., Negro, J.J., Torres, M.J., Gortázar, C., Vicente, J. 2014a. Unmanned aircraft systems for studying spatial abundance of ungulates: relevance to spatial epidemiology. *PLoS One* 9, e115608.
- Barasona, J.A., Latham, M.C., Acevedo, P., Armenteros, J.A., Latham, A.D., Gortázar, C., Carro, F., Soriguer, R.C., Vicente, J., 2014b. Spatiotemporal interactions between wild boar and cattle: implications for cross-species disease transmission. *Veterinary Research* 45, 122.

- Barasona, J.A., Acevedo, P., Díez-Delgado, I., Queirós, J., Carrasco-García, R., Gortázar, C., Vicente, J., 2016. Tuberculosis-associated death among adult wild boars, Spain, 2009-2014. *Emerging Infectious Diseases* 22, 2178-2180.
- Barasona, J.A., Vicente, J., Díez-Delgado, I., Aznar, J., Gortázar, C., Torres, M.J., 2017. Environmental presence of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in aggregation points at the wildlife/livestock interface. *Transboundary and Emerging Diseases* 64, 1148-1158.
- Barasona, J.A., Gortázar, C., de la Fuente, J., Vicente, J., 2019. Host richness increases tuberculosis disease risk in game-managed areas. *Microorganisms* 7, 182.
- Barberis, I., Bragazzi, N.L., Galluzzo, L., Martini, M., 2017. The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene* 58, E9-E12.
- Barbier, E., Boschirolì, M.L., Gueneau, E., Rochelet, M., Payne, A., de Cruz, K., Bliieux, A.L., Fossot, C., Hartmann, A., 2016. First molecular detection of *Mycobacterium bovis* in environmental samples from a French region with endemic bovine tuberculosis. *Journal of Applied Microbiology* 120, 1193-1207.
- Barlow, N.D., Kean, J.M., Hickling, G., Livingstone, P.G., Robson, A.B., 1997. A simulation model for the spread of bovine tuberculosis within New Zealand cattle herds. *Preventive Veterinary Medicine* 32, 57-75.
- Barongo, M.B., Bishop, R.P., Fevre, E.M., Knobel, D.L., Ssematimba, A., 2016. A mathematical model that simulates control options for African Swine Fever Virus (ASFV). *PLoS One* 11, e0158658.
- Bastida, F., Juste, R.A., 2011. Paratuberculosis control: a review with a focus on vaccination. *Journal of Immune based Therapies and Vaccines* 9, 8.
- BBC, 2011. Tuberculosis fraud tarnishing Northern Ireland farmers. <https://www.bbc.com/news/uk-northern-ireland-45744229>.
- Bedeir, S.A., 2004. Tuberculosis in Ancient Egypt. In: *Tuberculosis*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 3-13.
- Behr, M.A., Wilson, M.A., Gill, W.P., Salamon, H., Schoolnik, G.K., Rane, S., Small, P.M., 1999. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* 284, 1520-1523.
- Beltrán-Beck, B., Ballesteros, C., Vicente, J., de la Fuente, J., Gortázar, C., 2012. Progress in oral vaccination against tuberculosis in its main wildlife reservoir in Iberia, the Eurasian wild boar. *Veterinary Medicine International* 2012, 978501.
- Beltrán-Beck, B., de la Fuente, J., Garrido, J.M., Aranaz, A., Sevilla, I., Villar, M., Boadella, M., Galindo, R.C., Pérez de la Lastra, J.M., Moreno-Cid, J.A., Fernández de Mera, I.G., Alberdi, P., Santos, G., Ballesteros, C., Lyashchenko, K.P., Minguijón, E., Romero, B., de Juan, L., Domínguez, L., Juste, R., Gortázar, C., 2014a. Oral vaccination with heat inactivated *Mycobacterium bovis* activates the complement system to protect against tuberculosis. *PLoS One* 9, e98048.
- Beltrán-Beck, B., Romero, B., Boadella, M., Casal, C., Bezos, J., Mazariegos, M., Martín, M., Galindo, R.C., Pérez de la Lastra, J.M., Villar, M., Garrido, J.M., Sevilla, I.A., Asensio, F., Sicilia, J., Lyashchenko, K.P., Domínguez, L., Juste, R.A., de la Fuente, J., Gortázar, C., 2014b. Tonsils of the soft palate do not mediate the response of pigs to oral vaccination with heat-inactivated *Mycobacterium bovis*. *Clinical and Vaccine Immunology* 21, 1128-1136.

- Beltrán-Beck, B., Romero, B., Sevilla, I.A., Barasona, J.A., Garrido, J.M., González-Barrio, D., Díez-Delgado, I., Minguíjón, E., Casal, C., Vicente, J., Gortázar, C., 2014c. 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, 12-20.
- Bengis, R.G., Kock, R.A., Fischer, J., 2002. Infectious animal diseases: the wildlife/livestock interface. *Revue Scientifique et Technique* 21, 53-65.
- Benítez-Medina, J.M., 2015. Estudio epidemiológico de tuberculosis humana en Extremadura. Tesis doctoral, Universidad de Extremadura. Departamento de Sanidad Animal.
- 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. *Proceedings of the XXIII Congress Internacional ANEMBE of bovine medicine*, Vigo, Spain, 6th-8th June 2018.
- Berentsen, A.R., Miller, R.S., Misiewicz, R., Malmberg, J.L., Dunbar, M.R., 2014. Characteristics of white-tailed deer visits to cattle farms: implications for disease transmission at the wildlife-livestock interface. *European Journal of Wildlife Research* 60, 161-170.
- Bernabé, A., Gómez, M.A., Navarro, J.A., Gómez, S., Sánchez, J., Sidrach, J., Menchén, V., 1991. Pathological changes of spontaneous dual infection of tuberculosis and paratuberculosis in goats. *Small Ruminant Research* 5, 377-390.
- Bezós, J., de Juan, L., Romero, B., Álvarez, J., Mazzucchelli, F., Mateos, A., Domínguez, L., Aranaz, A., 2010. Experimental infection with *Mycobacterium caprae* in goats and evaluation of immunological status in tuberculosis and paratuberculosis co-infected animals. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 133, 269-275.
- Bezós, J., Álvarez, J., de Juan, L., Romero, B., Rodríguez, S., Castellanos, E., Saéz-Llorente, J.L., Mateos, A., Domínguez, L., Aranaz, A., 2011a. Factors influencing the performance of an interferon- γ assay for the diagnosis of tuberculosis in goats. *The Veterinary Journal* 190, 131-135.
- Bezós, J., Álvarez, J., de Juan, L., Romero, B., Rodríguez, S., Fernández-de-Mera, I.G., Hewinson, R.G., Vordermeier, M., Mateos, A., Domínguez, L., Aranaz, A., 2011b. Assessment of in vivo and in vitro tuberculosis diagnostic tests in *Mycobacterium caprae* naturally infected caprine flocks. *Preventive Veterinary Medicine* 100, 187-92.
- Bezós, J., Álvarez, J., Mínguez, O., Marqués, S., Martín, O., Vigo, V., Pieltain, C., Romero, B., Rodríguez, S., Casal, C., Mateos, A., Domínguez, L., de Juan, L., 2012a. Evaluation of specificity of tuberculosis diagnostic assays in caprine flocks under different epidemiological situations. *Research in Veterinary Science* 93, 636-640.
- Bezós, J., Álvarez, J., Moreno, I., de Juan, L., Romero, B., Rodríguez, S., Domínguez, M., Toraño, A., Mateos, A., Domínguez, L., Aranaz, A., 2012b. Study of peripheral blood cell populations involved in the immune response of goats naturally infected with *Mycobacterium caprae*. *Research in Veterinary Science* 93, 163-167.
- Bezós, J., Álvarez, J., Romero, B., Aranaz, A., de Juan, L., 2012c. Tuberculosis in goats: assessment of current in vivo cell-mediated and antibody-based diagnostic assays. *The Veterinary Journal* 191, 161-165.
- Bezós, J., Casal, C., Romero, B., Schroeder, B., Hardegger, R., Raeber, A.J., López, L., Rueda, P., Domínguez, L., 2014. Current ante-mortem techniques for diagnosis of bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science* 97, (Suppl. S44-52).

- 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, 185-189.
- Bezós, J., Casal, C., Puentes, E., Díez-Guerrier, A., Romero, B., Aguilo, 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.
- Bezós, J., Casal, C., Romero, B., Liandris, E., Sánchez, N., Vigo, V., Domínguez, L., de Juan, L., 2015c. Lack of interference with diagnostic testing for tuberculosis in goats experimentally exposed to *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *The Veterinary Journal* 205, 113-115.
- 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.
- Bezós, J., Roy, A., Infantes-Lorenzo, J.A., González, I., Venteo, A., 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.
- Biek, R., O'Hare, A., Wright, D., Mallon, T., McCormick, C., Orton, R.J., McDowell, S., Trewby, H., Skuce, R.A., Kao, R.R., 2012. Whole genome sequencing reveals local transmission patterns of *Mycobacterium bovis* in sympatric cattle and badger populations. *PLoS Pathogens* 8, e1003008.
- Biering-Sørensen, S., Aaby, P., Lund, N., Monteiro, I., Jensen, K.J., Eriksen, H.B., Schaltz-Buchholzer, F., Jørgensen, A.S.P., Rodrigues, A., Fisker, A.B., Benn, C.S., 2017. Early BCG-Denmark and neonatal mortality among infants weighting <2500 g: A randomized controlled trial. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 65, 1183.
- Biet, F., Boschirolí, M.L., 2014. Non-tuberculous mycobacterial infections of veterinary relevance. *Research in Veterinary Science*, (Suppl. 69-77).
- Birch, C.P.D., Goddard, A., Tearne, O., 2018. A new bovine tuberculosis model for England and Wales (BoTMEW) to simulate epidemiology, surveillance and control. *BMC Veterinary Research* 14, 273.
- Black, A., 2018. False TB claims by father and son an insult to farmers whose herds have the disease. *Farmers Guardian*, 10.
- 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* Deltamce2 double deletion mutant protects cattle against challenge with virulent *M. bovis*. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 93, 363-372.
- Boadella, M., Gortázar, C., 2011. Effect of haemolysis and repeated freeze-thawing cycles on wild boar serum antibody testing by ELISA. *BMC Research Notes* 4, 498.
- Boadella, M., Lyashchenko, K., Greenwald, R., Esfandiari, J., Jaroso, R., Carta, T., Garrido, J.M., Vicente, J., de la Fuente, J., Gortázar, C., 2011. Serologic tests for detecting antibodies against *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Eurasian wild boar (*Sus scrofa scrofa*). *The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23, 77-83.

- Boadella, M., Gortázar, C., Vicente, J., Ruiz-Fons, F., 2012. Wild boar: an increasing concern for Aujeszky's disease control in pigs?. *BMC Veterinary Research* 8, 7.
- Boletín Oficial del Estado, Ley 8/2003, de 24 de abril, de Sanidad Animal.
<https://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2003-8510>.
- Boniotti, M.B., Gorla, M., Loda, D., Garrone, A., Benedetto, A., Mondo, A., Tisato, E., Zanoni, M., Zoppi, S., Dondo, A., Tagliabue, S., Bonora, S., Zanardi, G., Pacciarini, M.L., 2009. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* strains isolated in Italy from 2000 to 2006 and evaluation of variable-number tandem repeats for geographically optimized genotyping. *Journal of Clinical Microbiology* 47, 636-644.
- Boniotti, M.B., Gaffuri, A., Gelmetti, D., Tagliabue, S., Chiari, M., Mangeli, A., Spisani, M., Nassuato, C., Gibelli, L., Sacchi, C., Zanoni, M., Pacciarini, M.L., 2014. Detection and molecular characterization of *Mycobacterium microti* isolates in wild boar from northern Italy. *Journal of Clinical Microbiology* 52, 2834-2843.
- Branscum, A.J., Gardner, I.A., Johnson, W.O., 2005. Estimation of diagnostic-test sensitivity and specificity through Bayesian modeling. *Preventive Veterinary Medicine* 68, 145-163.
- Braza, F., 2017. Gamo - *Dama dama* (Linnaeus, 1758). En: Enciclopedia Virtual de los Vertebrados Españoles. Salvador, A., Casinello, J., (eds). Museo Nacional de Ciencias Naturales, Madrid. Disponible en <http://www.vertebradosibericos.org/>
- Brito, B.P., Aly, S.S., Anderson, R.J., Fossler, C.P., Garry, F.B., Gardner, I.A., 2014. Association between caudal fold tuberculin test responses and results of an ELISA for *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* and mycobacterial culture of feces in tuberculosis-free dairy herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 244, 582-587.
- Brodin, P., Majlessi, L., Marsollier, L., de Jonge, M.I., Bottai, D., Demangel, C., Hinds, J., Neyrolles, O., Butcher, P.D., Leclerc, C., Cole, S.T., Brosch, R., 2006. Dissection of ESAT-6 system 1 of *Mycobacterium tuberculosis* and impact on immunogenicity and virulence. *Infection and Immunity* 74, 88-98.
- Broeckl, S., Krebs, S., Varadharajan, A., Straubinger, R.K., Blum, H., Buettner, M., 2017. Investigation of intra-herd spread of *Mycobacterium caprae* in cattle by generation and use of a whole-genome sequence. *Veterinary Research Communications* 41, 113-128.
- Brooks-Pollock, E., Conlan, A.J., Mitchell, A.P., Blackwell, R., McKinley, T.J., Wood, J.L., 2013. Age-dependent patterns of bovine tuberculosis in cattle. *Veterinary Research* 44, 97.
- Brooks-Pollock, E., Roberts, G.O., Keeling, M.J., 2014. A dynamic model of bovine tuberculosis spread and control in Great Britain. *Nature* 511, 228-231.
- Broughan, J.M., Downs, S.H., Crawshaw, T.R., Upton, P.A., Brewer, J., Clifton-Hadley, R.S., 2013. *Mycobacterium bovis* infections in domesticated non-bovine mammalian species. Part 1: review of epidemiology and laboratory submissions in Great Britain 2004–2010. *The Veterinary Journal* 198, 339-345.
- Broughan, J.M., Judge, J., Ely, E., Delahay, R.J., Wilson, G., Clifton-Hadley, R.S., Goodchild, A.V., Bishop, H., Parry, J.E., Downs, S.H., 2016. A review of risk factors for bovine tuberculosis infection in cattle in the UK and Ireland. *Epidemiology & Infection* 144, 2899-2926.
- Brown, D.H., Lafuse, W.P., Zwilling, B.S., 1998. Host resistance to mycobacteria is compromised by activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 840, 773-786.

- Bruning-Fann, C.S., Robbe-Austerman, S., Kaneene, J.B., Thomsen, J.B., Tilden Jr, J.D., Ray, J.S., Smith, R.W., Fitzgerald, S.D., Bolin, S.R., O'Brien, D.J., Mullaney, T.P., Stuber, T.P., Averill, J.J., Marks, D., 2017. Use of whole-genome sequencing and evaluation of the apparent sensitivity and specificity of antemortem tuberculosis tests in the investigation of an unusual outbreak of *Mycobacterium bovis* infection in a Michigan dairy herd. *Journal of the American Veterinary Association* 251, 206-216.
- Bryant, N.A., Davis-Poynter, N., Vanderplasschen, A., Alcamí, A., 2003. Glycoprotein G isoforms from some alphaherpesviruses function as broad-spectrum chemokine binding proteins. *The EMBO Journal* 22, 833-846.
- Buddle, B.M., de Lisle, G.W., Pfeffer, A., Aldwell, F.E., 1995a. Immunological responses and protection against *Mycobacterium bovis* in calves vaccinated with a low dose of BCG. *Vaccine* 13, 1123-1130.
- Buddle, B.M., Keen, D., Thomson, A., Jowett, G., McCarthy, A.R., Heslop, J., De Lisle, G.V., Stanford, J.L., Aldwell, F.E., 1995b. Protection of cattle from bovine tuberculosis by vaccination with BCG by the respiratory or subcutaneous route, but not by vaccination with killed *Mycobacterium vaccae*. *Research in Veterinary Science* 59, 10-16.
- Buddle, B.M., Aldwell, F.E., Keen, D.L., Parlane, N.A., Hamel, K.L., Lisle, G.D., 2006. Oral vaccination of brushtail possums with BCG: investigation into factors that may influence vaccine efficacy and determination of duration of protection. *New Zealand The Veterinary Journal* 54, 224-230.
- Buddle, B.M., Wilson, T., Denis, M., Greenwald, R., Esfandiari, J., Lyashchenko, K.P., Liggett, S., Mackintosh, C.G., 2010. Sensitivity, specificity, and confounding factors of novel serological tests used for the rapid diagnosis of bovine tuberculosis in farmed red deer (*Cervus elaphus*). *Clinical and Vaccine Immunology* 17, 626-630.
- Buddle, B.M., Wedlock, D.N., Denis, M., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., 2011. Update on vaccination of cattle and wildlife populations against tuberculosis. *Veterinary Microbiology* 151, 14-22.
- Buddle, B.M., de Lisle, G.W., Griffin, J.F.T., Hutchings, S.A., 2015. Epidemiology, diagnostics, and management of tuberculosis in domestic cattle and deer in New Zealand in the face of a wildlife reservoir. *New Zealand Veterinary Journal* 63, 19-27.
- Buddle, B.M., Vordermeier, H.M., Chambers, M.A., de Klerk-Lorist, L.M., 2018. Efficacy and safety of BCG vaccine for control of tuberculosis in domestic livestock and wildlife. *Frontiers in Veterinary Science* 5, 259.
- Buendía, A.J., Navarro, J.A., Salinas, J., McNair, J., de Juan, L., Ortega, N., Cámara, P., Torreblanca, P., Sánchez, J., 2013. Ante-mortem diagnosis of caprine tuberculosis in persistently infected herds: influence of lesion type on the sensitivity of diagnostic tests. *Research in Veterinary Science* 95, 1107-1113.
- Burbaiteè, L., Csányi, S., 2009. Roe deer population and harvest changes in Europe. *Estonian Journal of Ecology* 58, 169-180.
- Busch, F., Bannerman, F., Liggett, S., Griffin, F., Clarke, J., Lyashchenko, K.P., Rhodes, S., 2017. Control of bovine tuberculosis in a farmed red deer herd in England. *Veterinary Record* 180, 68.
- Buss, B.F., Keyser-Metobo, A., Rother, J., Holtz, L., Gall, K., Jereb, J., Murphy, C.N., Iwen, P.C., Robbe-Austerman, S., Holcomb, M.A. et al., 2016. Possible airborne person-to-person transmission of *Mycobacterium bovis* — Nebraska 2014–2015. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 65, 197-201.

- Buza, J.J., Hikono, H., Mori, Y., Nagata, R., Hirayama, S., Aodon-geril, Bari, A.M., Shu, Y., Tsuji, N.M., Momotani, E., 2004. Neutralization of interleukin-10 significantly enhances gamma interferon expression in peripheral blood by stimulation with Johnin purified protein derivative and by infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in experimentally infected. *Infection and Immunity* 72, 2425-2428.
- Byrne, A.W., Quinn, J.L., O’Keeffe, J.J., Green, S., Sleeman, D.P., Martin, S.W., Davenport, J., 2014. Large-scale movements in European badgers: has the tail of the movement kernel been underestimated?. *The Journal of Animal Ecology* 83, 991-1001.
- Byrne, A.W., Guelbenzu-Gonzalo, M., Strain, S.A.J., McBride, S., Graham, J., Lahuerta-Marín, A., Harwood, R., Graham, D.A., McDowell, S., 2017. Assessment of concurrent infection with bovine viral diarrhoea virus (BVDV) and *Mycobacterium bovis*: A herd-level risk factor analysis from Northern Ireland. *Preventive Veterinary Medicine* 141, 38-47.
- Byrne, A.W., Graham, J., Milne, G., Guelbenzu-Gonzalo, M., Strain, S., 2019. Is there a relationship between bovine tuberculosis (bTB) herd breakdown risk and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* status? An investigation in bTB chronically and non-chronically infected herds. *Frontiers in Veterinary Science* 6, 30.
- Cadmus, S.I., Adesokan, H.K., Jenkins, A.O., van Soolingen, D., 2009. *Mycobacterium bovis* and *M. tuberculosis* in goats, Nigeria. *Emerging Infectious Diseases* 15, 2066-2067.
- Cagiola, M., Feliziani, F., Severi, G., Pasquali, P., Rutili, D., 2004. Analysis of possible factors affecting the specificity of the gamma interferon test in tuberculosis-free cattle herds. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 11, 952-956.
- Calmette, A., Guérin, C., Bouquet, A., Negre, L., 1927. La vaccination préventive contre la tuberculose par le “BCG”. Masson et cie, Paris.
- Calmette, A., Guérin, C., 1929. Schutzzimpfungsversuche gegen Rindertuberkulose. *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift* 55, 2173-2175.
- Caminiti, A., Pelone, F., La Torre, G., De Giusti, M., Saulle, R., Mannocci, A., Sala, M., Della Marta, U., Scaramozzino, P., 2016. Control and eradication of tuberculosis in cattle: A systematic review of economic evidence. *Veterinary Record* 179, 70-75.
- Cano-Terriza, D., Risalde, M.A., Rodríguez-Hernández, P., Napp, S., Fernández-Morente, M., Moreno, I., Bezos, J., Fernández-Molera, V., Sáez, J.L., García-Bocanegra, I., 2018a. Epidemiological surveillance of *Mycobacterium tuberculosis* complex in extensively raised pigs in the south of Spain. *Preventive Veterinary Medicine* 159, 87-91.
- Cano-Terriza, D., Risalde, M.A., Jiménez-Ruiz, S., Vicente, J., Isla, J., Paniagua, J., Moreno, I., Gortázar, C., Infantes-Lorenzo, J.A., García-Bocanegra, I., 2018b. Management of hunting waste as control measure for tuberculosis in wild ungulates in south-central Spain. *Transboundary and Emerging Diseases* 65, 1190-1196.
- Cardoso, M.A., Cardoso, R.F., Hirata, R.D.C., Hirata, M.H., Leite, C.Q.F., Santos, A.C.B., Siqueira, V.L.D., Okano, W., Rocha, N.S., Lonardoní, M.V.C., 2009. Direct detection of *Mycobacterium bovis* in bovine lymph nodes by PCR. *Zoonoses Public Health* 56, 465-470.
- Cardoso-Toset, F., Gómez-Laguna, J., Amarilla, S.P., Vela, A.I., Carrasco, L., Fernández-Garayzábal, J.F., Astorga, R.J., Luque, I., 2015. Multi-etiological nature of tuberculosis-like lesions in condemned pigs at the slaughterhouse. *PLoS One* 10, e0139130.
- Cardoso-Toset, F., Luque, I., Carrasco, L., Jurado-Martos, F., Risalde, M.A., Venteo, A., Infantes-Lorenzo, J.A., Bezos, J., Rueda, P., Tapia, I., Gortázar, C., Domínguez, L., Domínguez, M., Gómez-Laguna, J., 2017. Evaluation of five serologic assays for bovine

- tuberculosis surveillance in domestic free-range pigs from southern Spain. *Preventive Veterinary Medicine* 137, 101-104.
- 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, 65-78.
- 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* 2, 5.
- Casades-Martí, L., Martínez-Guijosa, J., González-Barrio, D., Gortázar, C., Royo-Hernández, L., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Aranaz, A., Ruiz-Fons, F., 2017. Development of bait dispensing strategies in managed environments for the treatment of deer (*Cervus elaphus*): are they palatable and selective?. *Proceedings of the XIII Congress of the Spanish Society for the Conservation and Study of Mammals (SECEM)*, Guadalajara, España, 6th-9th December 2017 pp. 24.
- Casal, C., 2015. Diagnóstico de tuberculosis en rumiantes y camélidos: optimización de pruebas de base celular y humoral. Thesis, doctorate in Veterinary Medicine, Animal Health. University of Madrid, Spain.
- Casal, C., Díez-Guerrier, A., Álvarez, J., Rodríguez-Campos, S., Mateos, A., Linscott, R., Martel, E., Lawrence, J.C., Whelan, C., Clarke, J., O'Brien, A., Domínguez, L., Aranaz, A., 2014. Strategic use of serology for the diagnosis of bovine tuberculosis after intradermal skin testing. *Veterinary Microbiology* 170, 342-351.
- Casal, C., Álvarez, J., Bezos, J., Quick, H., Díez-Guerrier, A., Romero, B., Sáez, J.L., Liandris, E., Navarro, A., Pérez, A., Domínguez, L., de Juan, L., 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* 121, 86-92.
- Casal, C., Infantes, J.A., Rialde, 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.
- 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, 58-63.
- Cezar, R.D., Lucena-Silva, N., Borges, J.M., Santana, V.L., Pinheiro Junior, J.W., 2016. Detection of *Mycobacterium bovis* in artisanal cheese in the state of Pernambuco, Brazil. *International Journal of Mycobacteriology* 5, 269-272.
- 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.
- 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.
- Ciaravino, G., Espluga, J., Casal, J., Pacios, A., Mercader, I., Allepuz, A., 2020. Profiles of opinions among farmers and veterinarians towards the Tuberculosis Eradication Programme in cattle in Spain. *Preventive Veterinary Medicine* 176, 104941.

- Clegg, T.A., Duignan, A., Whelan, C., Gormley, E., Good, M., Clarke, J., Toft, N., More, S.J., 2011. Using latent class analysis to estimate the test characteristics of the γ -interferon test, the single intradermal comparative tuberculin test and a multiplex immunoassay under Irish conditions. *Veterinary Microbiology* 151, 68-76.
- Coad, M., Hewinson, R.G., Clifford, D., Vordermeier, H.M., Whelan, A.O., 2007. Influence of skin testing and blood storage on interferon-gamma production in cattle affected naturally with *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Record* 160, 660-662.
- Coad, M., Clifford, D., Rhodes, S.G., Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M., Whelan, A.O., 2010. Repeat tuberculin skin testing leads to desensitisation in naturally infected tuberculous cattle which is associated with elevated interleukin-10 and decreased interleukin-1 beta responses. *Veterinary Research* 41, 14.
- Coad, M., Clifford, D.J., Vordermeier, H.M., Whelan, A.O., 2013. The consequences of vaccination with the Johne's disease vaccine, Gudair, on diagnosis of bovine tuberculosis. *The Veterinary Record* 172, 266.
- Cockle, P.J., Gordon, S.V., Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M., 2006. Field evaluation of a novel differential diagnostic reagent for detection of *Mycobacterium bovis* in cattle. *Clinical and Vaccine Immunology* 13, 1119-1124.
- Conlan, A.J.K., McKinley, T.J., Karolemeas, K., Pollock, E.B., Goodchild, A.V., Mitchell, A.P., Birch, C.P., Clifton-Hadley, R.S., Wood, J.L., 2012. Estimating the hidden burden of bovine tuberculosis in Great Britain. *PLoS Computational Biology* 8, e1002730.
- Conlan, A.J.K., Pollock, E.B., Mckinley, T.J., Mitchell, A.P., Jones, G.J., Vordermeier, M., Wood, J.L.N., 2015. Potential benefits of cattle vaccination as a supplementary control for bovine tuberculosis. *PLoS Computational Biology* 11, 1004038.
- Conlan, A.J.K., Vordermeier, M., de Jong, M.C., Wood, J.L., 2018. The intractable challenge of evaluating cattle vaccination as a control for bovine Tuberculosis. *Elife* 7, e27694.
- Cooper, M.J., Moore, C.S., Moran, J.L., Thompson, R.J., 2010. Efficient use of trusted third parties for additional content-sharing security. U.S. Patent No 7,742,697.
- Corner L.A., 1994. Post mortem diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Microbiology* 40, 53-63.
- Corner, L.A., 2006. The role of wild animal populations in the epidemiology of tuberculosis in domestic animals: how to assess the risk. *Veterinary Microbiology*, 112, 303-312.
- Corner, L.A., Trajstman, A.C., 1988. An evaluation of 1-hexadecylpyridinium chloride as a decontaminant in the primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine lesions. *Veterinary Microbiology* 18, 127-134.
- Corner, L.A., Melville, L., McCubbin, K., Small, K.J., McCormick, B.S., Wood, P.R., Rothel, J.S., 1990. Efficiency of inspection procedures for the detection of tuberculous lesions in cattle. *Australian Veterinary Journal* 67, 389-392.
- Corner, L.A., Trajstman, A.C., Lund, K., 1995. Determination of the optimum concentration of decontaminants for the primary isolation of *Mycobacterium bovis*. *New Zealand Veterinary Journal* 43, 129-133.
- Corner, L.A., Costello, E., O'Meara, D., Lesellier, S., Aldwell, F.E., Singh, M., Hewinson, R.G., Chambers, M.A., Gormley, E., 2010. Oral vaccination of badgers (*Meles meles*) with BCG and protective immunity against endobronchial challenge with *Mycobacterium bovis*. *Vaccine* 28, 6265-6272.

- Corner, L.A.L., Gormley, E., Pfeiffer, D.U., 2012. Primary isolation of *Mycobacterium bovis* from bovine tissues: Conditions for maximising the number of positive cultures. *Veterinary Microbiology* 156, 162-171.
- Corripio-Miyar, Y., Mellanby, R.J., Morrison, K., McNeilly, T.N., 2017. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 modulates the phenotype and function of Monocyte derived dendritic cells in cattle. *BMC Veterinary Research* 13, 390.
- Cosgrove, M.K., H.C. Ill., Schmitt, S.M., Marks, D.R., Wilson, A.S., O'Brien, D.J., 2012. Live-trapping and bovine tuberculosis testing of free-ranging white-tailed deer for targeted removal. *Wildlife Research* 39, 104-111.
- Cosivi, O., Grange, J.M., Daborn, C.J., Raviglione, M.C., Fujikura, T., Cousins, D., Robinson, R.A., Huchzermeyer, H. F. A. K., De Kantor, I., Meslin, F.X., 1998. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerging Infectious Diseases* 4, 59-70.
- 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, e81337.
- Costa, P., Amaro, A., Ferreira, A.S., Machado, D., Albuquerque, T., Couto, I., Botelho, A., Viveiros, M., Inácio, J., 2014a. 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.
- Costa, P., Botelho, A., Couto, I., Viveiros, M., Inácio, J., 2014b. Standing of nucleic acid testing strategies in veterinary diagnosis laboratories to uncover *Mycobacterium tuberculosis* complex members. *Frontiers in Molecular* 1, 16.
- Costa, P., Couto, I., Viveiros, M., Inácio, J., 2015. Nested and multiplex real-time PCR using dual-labeled probes: detecting and discriminating *Mycobacterium tuberculosis* complex members in cultures and animal tissues. *Journal of Microbiological Methods* 1247, 133-143.
- Costello, E., Doherty, M.L., Monaghan, M.L., Quigley, F.C., O'Reilly, P.F., 1998. A study of cattle-to-cattle transmission of *Mycobacterium bovis* infection. *The Veterinary Journal* 155, 245-250.
- Courcou, A., Moyen, J.L., Brugère, L., Faye, S., Hénault, S., Gares, H., Boschioli, M.L., 2014. Estimation of sensitivity and specificity of bacteriology, histopathology and PCR for the confirmatory diagnosis of bovine tuberculosis using latent class analysis. *PLoS One* 9, e90334.
- Cousins, D.V., 2001. *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. *Revue scientifique et technique/Office International des Épizooties* 20, 71-85.
- Cousins, D.V., Florisson, N., 2005. A review of tests available for use in the diagnosis of tuberculosis in non-bovine species. *Revue scientifique et technique/Office International des Épizooties* 24, 1039-1059.
- Couvin, D., David, A., Zozio, T., Rastogi, N., 2019. Macro-geographical specificities of the prevailing tuberculosis epidemic as seen through SITVIT2, an updated version of the *Mycobacterium tuberculosis* genotyping database. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 72, 31-43.
- Cowie, C.E., Beck, B.B., Gortázar, C., Vicente, J., Hutchings, M.R., Moran, D., White, P.C., 2014a. Risk factors for the detected presence of *Mycobacterium bovis* in cattle in south central Spain. *European Journal of Wildlife Research*, 60, 113-123.

- Cowie, C.E., Marreos, N., Gortázar, C., Jaroso, R., White, P.C., Balseiro, A., 2014b. Shared risk factors for multiple livestock diseases: a case study of bovine tuberculosis and brucellosis. *Research in Veterinary Science* 97, 491-497.
- 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, 51-64.
- Crawshaw, T., Daniel, R., Clifton-Hadley, R., Clark, J., Evans, H., Rolfe, S., de la Rua-Domenech, R., 2008. TB in goats caused by *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Record* 163, 127.
- 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, 754-765.
- Cuezva-Samaniego, J., 1954. Las campañas contra tuberculosis bovina en Vizcaya. Gráficas RD S. L. L., Bilbao, Spain.
- Cuezva-Samaniego, J., 1966. Erradicación de la tuberculosis bovina. Avigan, Valencia. Spain.
- 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.
- Chambers, M.A., 2013. Review of the diagnosis of tuberculosis in non-bovid wildlife species using immunological methods-an update of published work since 2009. *Transboundary and Emerging Diseases* 60 (Suppl. 1), 14-27.
- Chambers, M.A., Rogers, F., Delahay, R.J., Lesellier, S., Ashford, R., Dalley, D., Gowtage, S., Davé, D., Palmer, S., Brewer, J., Crawshaw, T., Clifton-Hadley, R., Carter, S., Cheeseman, C., Hanks, C., Murray, A., Palphramand, K., Pietravalle, S., Smith, G.C., Tomlinson, A., Walker, N.J., Wilson, G.J., Corner, L.A., Rushton, S.P., Shirley, M.D., Gettinby, G., McDonald, R.A., Hewinson, R.G., 2011. Bacillus Calmette-Guérin vaccination reduces the severity and progression of tuberculosis in badgers. *Proceedings of the Royal Society B. Biological Sciences* 278, 1913-1920.
- Chambers, M.A., Aldwell, F., Williams, G.A., Palmer, S., Gowtage, S., Ashford, R., Dalley, D.J., Davé, D., Weyer, U., Salguero, F.J., Nunez, A., Nadian, A.K., Crawshaw, T., Corner, L.A., Lesellier, S., 2017. The Effect of oral vaccination with *Mycobacterium bovis* BCG on the development of tuberculosis in captive European badgers (*Meles meles*). *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7, 6.
- Charleston, B., Hope, J.C., Carr, B.V., Howard, C.J., 2001. Masking of two in vitro immunological assays for *Mycobacterium bovis* (BCG) in calves acutely infected with non-cytopathic bovine viral diarrhoea virus. *Veterinary Record* 149, 481-484.
- Chartier, C., Mercier, P., Pellet, M.P., Vialard, J., 2012. Effect of an inactivated paratuberculosis vaccine on the intradermal testing of goats for tuberculosis. *The Veterinary Journal* 191, 360-363.
- Che'Amat, A., González-Barrio, D., Ortiz, J.A., Díez-Delgado, I., Boadella, M., Barasona, J.A., Bezos, J., Romero, B., Armenteros, J.A., Lyashchenko, K.P., Venteo, A., Rueda, P., Gortázar, C., 2015. Testing Eurasian wild boar piglets for serum antibodies against *Mycobacterium bovis*. *Preventive Veterinary Medicine* 121, 93-98.
- Che'Amat, A., Risalde, M.A., González-Barrio, D., Ortiz, J.A., Gortázar, C., 2016a. Effects of repeated comparative intradermal tuberculin testing on test results: a longitudinal study in TB-free red deer. *BMC Veterinary Research* 12, 184.

- 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., 2016b. Is targeted removal a suitable means for tuberculosis control in wild boar?. *Preventive Veterinary Medicine* 135, 132-135.
- Chiari, M., Ferrari, N., Giardiello, D., Avisani, D., Pacciarini, M.L., Alborali, L., Zanoni, M., Boniotti, M.B., 2016. Spatiotemporal and ecological patterns of *Mycobacterium microti* infection in wild boar (*Sus scrofa*). *Transboundary and Emerging Diseases* 63, e381-e388.
- Cho, Y.S., Dobos, K.M., Prenni, J., Yang, H., Hess, A., Rosenkrands, I., Andersen, P., Ryoo, S.W., Bai, G.H., Brennan, M.J., Izzo, A., Bielefeldt-Ohmann, H., Belisle, J.T., 2012. Deciphering the proteome of the in vivo diagnostic reagent "purified protein derivative" from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proteomics* 12, 979-991.
- Cho, Y.S., Jang, Y.B., Lee, S.E., Cho, J.Y., Ahn, J.M., Hwang, I., Heo, E., Nam, H.M., Cho, D., Her, M., Jean, Y.H., Jung, S.C., Kim, J.M., Lee, H.S., Lee, K., Belisle, J.T., 2015. Short communication: Proteomic characterization of tuberculin purified protein derivative from *Mycobacterium bovis*. *Research in Veterinary Science* 101, 117-119.
- Christley, R.M., Mort, M., Wynne, B., Wastling, J.M., Heathwaite, A.L., Pickup, R., Austin, Z., Latham, S.M., 2013. "Wrong, but useful": negotiating uncertainty in infectious disease modelling. *PLoS One* 8, e76277.
- Dalley, D., Davé, D., Lesellier, S., Palmer, S., Crawshaw, T., Hewinson, R.G., Chambers, M., 2008. Development and evaluation of a gamma-interferon assay for tuberculosis in badgers (*Meles meles*). *Tuberculosis* 88, 235-243.
- Daniel, R., Evans, H., Rolfe, S., de la Rua-Domenech, R., Crawshaw, T., Higgins, R.J., Schock, A., Clifton-Hadley, R., 2009. Outbreak of tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in golden Guernsey goats in Great Britain. *Veterinary Record* 165, 335-342.
- Das, S.D., Narayanan, S., Hari, L., Hoti, S.L., Thangathurai, R.K., Charles, N., Jaggarajamma, K., Narayanan, P.R., 2005. Differentiation of highly prevalent IS6110 single-copy strains of *Mycobacterium tuberculosis* from a rural community in South India with an ongoing DOTS programme. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 5, 67-77.
- Dean, G.S., Clifford, D., Whelan, A.O., Tchilian, E.Z., Beverley, P.C., 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, e0142270.
- Dean, A.S., Forcella, S., Olea-Popelka, F., Idrissi, A.E., Glaziou, P., Benyahia, A., Mumford, E., Erlacher-Vindel, E., Gifford, G., Lubroth, J. et al., 2018. A roadmap for zoonotic tuberculosis: a One Health approach to ending tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases* 18, 137-138.
- De Benito, J., de March, P., Balfagón, P., Caylà, J.A., 2005. Bovine tuberculosis in Spain. *Medicina Clínica* 125, 475.
- DEFRA 2011. Vet asked to do all they can to help prevent TB fraud. *Veterinary Record* 168, 367.
- DEFRA, 2019. Quarterly TB in cattle in Great Britain statistics notice (data to March 2019). https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/808149/bovinetb-statsnotice-Q1-quarterly-12jun19.pdf

- De Klerk, L.M., Michel, A.L., Bengis, R.G., Kreik, N.P., Godfroid, J., 2010. BCG vaccination failed to protect yearling African buffaloes (*Syncerus caffer*) against experimental intratonsillar challenge with *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Immunology Immunopathology* 137, 84-92.
- De la Cruz, M.L., Branscum, A.J., Nacar, 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* 5, 229.
- De la Fuente, J., Gortázar, C., Juste, R., 2016. Complement component 3: a new paradigm in tuberculosis vaccine. *Expert Review of Vaccines* 15, 275-277.
- Delahay, R.J., Smith, G.C., Barlow, A.M., Walker, N., Harris, A., Clifton-Hadley, R.S., Cheeseman, C.L., 2007. Bovine tuberculosis infection in wild mammals in the South-West region of England: a survey of prevalence and a semi-quantitative assessment of the relative risks to cattle. *The Veterinary Journal*, 173, 287-301.
- De la Rúa-Domenech, R., 2006. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis* 86, 77-109.
- De la Rúa-Domenech, R., Goodchild, A.T., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., Christiansen, K.H., Clifton-Hadley, R.S., 2006. Ante mortem diagnosis of tuberculosis in cattle: a review of the tuberculin tests, gamma-interferon assay and other ancillary diagnostic techniques. *Research in Veterinary Science* 81, 190-210.
- Demidchik, V., Maathuis, F.J.M., 2007. Physiological roles of nonselective cation channels in plants: From salt stress to signalling and development. *New Phytologist* 175, 387-404.
- Denis, M., Wedlock, D.N., McCarthy, A.R., Parlane, N.A., Cockle, P.J., Vordermeier, H.M., Hewinson, R.G., Buddle, B.M., 2007. Enhancement of the sensitivity of the whole-blood gamma interferon assay for diagnosis of *Mycobacterium bovis* infections in cattle. *Clinical and Vaccine Immunology* 14, 1483-1489.
- Devonshire, A.S., Honeyborne, I., Gutteridge, A., Whale, A.S., Nixon, G., Wilson, P., Jones, G., McHugh, T.D., Foy, C.A., Huggett, J.F., 2015. Highly Reproducible Absolute Quantification of *Mycobacterium tuberculosis* Complex by Digital PCR. *Analytical Chemistry* 87, 3706-3713.
- Dey, B., Jain, R., Khera, A., Rao, V., Dhar, N., Gupta, U.D., Katoch, V.M., Ramanathan, V.D., Tyagi, A.K., 2009. Boosting with a DNA vaccine expressing ESAT-6 (DNAE6) obliterates the protection imparted by recombinant BCG (rBCGE6) against aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection in guinea pigs. *Vaccine* 28, 63-70.
- Di Blasio, A., Irico, L., Zoppi, S., de Somma, D., Barberi, G., Varello, K., Monnier, M., Bozzetta, E., Vignetta, P., Chiavacci, L., Gorla, M., Dondo, A., 2017. La gestione di un focolaio di tubercolosi bovina in un allevamento promiscuo di capre e bovini. *Large Animal Review* 23, 73-76.
- Diccionario Real Academia Española, 2014. Definición de suprimir. «Diccionario la Leng. española» - Edición del Tricentenario, 23a edición. <https://dle.rae.es/suprimir> (accesed 9.5.2019).
- Diccionario Real Academia Española, 2019. Definición de fraude. «Diccionario la Leng. española» - Edición del Tricentenario, 23a edición. <https://dle.rae.es/?id=IQS313i>
- Diel, R., Loddenkemper, R., Meywald-Walter, K., Niemann, S., Nienhaus, A., 2008. Predictive Value of a Whole Blood IFN- γ Assay for the development of active

- tuberculosis disease after recent infection with *Mycobacterium tuberculosis*. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 177, 1164-1170.
- Diel, R., Loddenkemper, R., Niemann, S., Meywald-Walter, K., Nienhaus, A., 2011. Negative and positive predictive value of a whole-blood interferon- γ release assay for developing active tuberculosis. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 183, 88-95.
- Díez-Delgado, I., Rodríguez, O., Boadella, M., Garrido, J.M., Sevilla, I.A., Bezos, J., Juste, R., Domínguez, L., Gortázar, C., 2016. Parenteral vaccination with heat-inactivated *Mycobacterium bovis* reduces the prevalence of tuberculosis-compatible lesions in farmed wild boar. Transboundary and Emerging Diseases 64, e18-e21.
- Díez-Delgado, I., Rodríguez, O., Boadella, M., Garrido, J.M., Sevilla, I.A., Bezos, J., Juste, R., Domínguez, L., Gortázar, C., 2017. Parenteral vaccination with heat-inactivated *Mycobacterium bovis* reduces the prevalence of tuberculosis-compatible lesions in farmed wild boar. Transboundary and Emerging Diseases 64, e18-e21.
- 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., Gortázar, C., 2018. Impact of piglet oral vaccination against tuberculosis in endemic free-ranging wild boar populations. Preventive Veterinary Medicine 155, 11-20.
- Díez-Delgado, I., Sevilla, I.A., Garrido, J.M., Romero, B., Geijo, M.V., Domínguez, L., Juste, R.A., Aranaz, A., de la Fuente, J., Gortázar, C., 2019. Tuberculosis vaccination sequence effect on protection in wild boar. Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases 66, 101329.
- Díez-Guerrier, A., Roy, A., de la Cruz, M.L., Sáez, J.L., Sanz, C., Boschirolí, 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.
- Di-Marco, V., Mazzone, P., Capucchio, M.T., Boniotti, M.B., Aronica, V., Russo, M., Fiasconaro, M., Cifani, N., Corneli, S., Biasibetti, E., Biagetti, M., Pacciarini, M.L., Cagiola, M., Pasquali, P., Marianelli, C., 2012. Epidemiological significance of the domestic black pig (*Sus scrofa*) in maintenance of bovine tuberculosis in Sicily. Journal of Clinical Microbiology 50, 1209-1218.
- Directiva 64/432/CEE, de 26 de Junio 1964, relativa a problemas de policía sanitaria en materia de intercambios intracomunitarios de animales de las especies bovina y porcina. https://www.mapa.gob.es/es/desarrollo-rural/temas/programas-ue/Directiva_64-432_CE_26_junio_tcm30-73040.pdf
- Directiva 78/52/CEE, de 13 de Diciembre 1977, por la que se establecen los criterios comunitarios aplicables a los planes nacionales de erradicación acelerada de la brucelosis, de la tuberculosis y la leucosis enzoótica de los bovinos. <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/e3ab2356-c2af-4d23-92ec-4f5d00a004ac/language-es>
- Dobbelaer, R., O'Reilly, L.M., Genicot, A., Haagsma, J., 1983. The potency of bovine PPD tuberculin in guinea-pigs and in tuberculous cattle. Journal of Biological Standardization 11, 213-220.
- Doherty, M.L., Bassett, H.F., Quinn, P.J., Davis, W.C., Monaghan, M.L., 1995. Effects of dexamethasone on cell-mediated immune responses in cattle sensitized to *Mycobacterium bovis*. American Journal of Veterinary Research 56, 1300-1306.

- Domingo, M., Liébana, E., Carrera, J., Vilafranca, M., Casal, J., Aranaz, A., Altimira, J., Vidal, D., Marco, A., Planell, J.M., Mateos, A., Domínguez, L., 1995. Eficacia comparativa de la intradermoreacción y de la prueba de liberación de gamma-interferón para el diagnóstico de la tuberculosis bovina en una prueba de campo. *Medicina Veterinaria* 12, 307-317.
- Domingo, M., Gil, O., Serrano, E., Guirado, E., Nofrarias, M., Grassa, M., Caceres, N., Pérez, B., Vilaplana, C., Cardona, P.J., 2009. Effectiveness and safety of a treatment regimen based on isoniazid plus vaccination with *Mycobacterium tuberculosis* cells' fragments: field-study with naturally *Mycobacterium caprae*-infected goats. *Scandinavian Journal of Immunology* 69, 500-507.
- Domingo, M., Vidal, E., Marco, A., 2014. Pathology of bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science* 97, S20-S29.
- Domínguez, L., 2011. Las micobacterias como ejemplo de patógenos en la interfase hombre animal. Discurso de Ingreso en la Real Academia de Doctores de España.
- Domínguez, L., Bezos, J., 2014. Tuberculosis: una enfermedad compartida entre hombres y animales. Los Libros de la Catarata, Madrid, Spain.
- Domínguez, J., Ruiz-Manzano, J., De Souza-Galvao, M., Latorre, I., Mila, C., Blanco, S., Jiménez, M.A., Prat, C., Lacoma, A., Altet, N., Ausina, V., 2008. Comparison of two commercially available gamma interferon blood tests for immunodiagnosis of tuberculosis. *Clinical and Vaccine Immunology* 15, 168-171.
- Donnelly, C.A., Woodroffe, R., Cox, D.R., Bourne, F.J., Cheeseman, C.L., Clifton-Hadley, R.S., Wei, G., Gettinby, G., Gilks, P., Jenkins, H., Johnston, W.T., Le Fevre, A.M., McInerney, J.P., Morrison, W.I., 2005. Positive and negative effects of widespread badger culling on tuberculosis in cattle. *Nature* 439, 843-846.
- Donoghue, H.D., Spigelman, M., Greenblatt, C.L., Lev-Maor, G., Bar-Gal, G.K., Matheson, C., Vernon, K., Nerlich, A.G., Zink, A.R., 2004. Tuberculosis: from prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA. *The Lancet. Infectious Diseases* 4, 584-592.
- Downs, S.H., Durr, P., Edwards, J., Clifton-Hadley, R., 2008. Trace micro-nutrients may affect susceptibility to bovine tuberculosis in cattle. *Preventive Veterinary Medicine* 87, 311-326.
- Downs, S.H., Parry, J.E., Upton, P.A., Broughan, J.M., Goodchild, A.V., Nuñez-García, J., Greiner, M., Abernethy, D.A., Cameron, A.R., Cook, A.J., de la Rua-Domenech, R., Gunn, J., Pritchard, E., Rhodes, S., Rolfe, S., Sharp, M., Vordermeier, H.M., Watson, E., Welsh, M., Whelan, A.O., Woolliams, J.A., More, S.J., Clifton-Hadley, R.S., 2018. Methodology and preliminary results of a systematic literature review of ante-mortem and post-mortem diagnostic tests for bovine tuberculosis. *Preventive Veterinary Medicine* 153, 117-126.
- Duarte, E.L., Domingos, M., Amado, A., Botelho, A., 2008. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* animal isolates. *Veterinary Microbiology* 130, 415-421.
- 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, 299-306.
- Duarte, J., Farfán, M.A., Fa, J.E., Vargas, J.M., 2015. Deer populations inhabiting urban areas in the south of Spain: habitat and conflicts. *European Journal of Wildlife Research*, 61, 365-377.

- Dubovi, E.J., 2018. Bovine viral diarrhoea and mucosal disease. En: Infectious Diseases of Livestock. Second Edn. Oxford University Press Southern Africa, Cape Town, South Africa, pp. 47.
- Dunn, J.R., Kaneene, J.B., Grooms, D.L., Bolin, S.R., Bolin, C.A., Bruning-Fann, C.S., 2005. Effects of positive results for *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* as determined by microbial culture of feces or antibody ELISA on results of caudal fold tuberculin test and interferon- γ assay for tuberculosis in cattle. Journal of the American Veterinary Medical Association, 226, 429-435.
- Eisenach, K.D., Cave, M.D., Bates, J.H., Crawford, J.T., 1990. Polymerase Chain reaction amplification of a repetitive DNA sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis*. The Journal of Infectious Diseases 161, 977-981.
- Ejeh, E.F., Raji, M.A., Bello, M., Lawan, F.A., Francis, M.I., Kudi, A.C., Cadmus, S.I.B., 2014. Prevalence and direct economic losses from bovine tuberculosis in Makurdi, Nigeria. Veterinary Medicine International 2014, 904861.
- Elsayed, M.S.A.E., Amer, A., 2019. The rapid detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex members from cattle and water buffaloes in the delta area of Egypt, using a combination of real-time and conventional PCR. Molecular Biology Reports 46, 3909-3919.
- Emery, D.L., Whittington, R.J., 2004. An evaluation of mycophage therapy, chemotherapy and vaccination for control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. Veterinary Microbiology 104, 143-155.
- Enøe, C., Georgiadis, M.P., Johnson, W.O., 2000. Estimation of sensitivity and specificity of diagnostic tests and disease prevalence when the true disease state is unknown. Preventive Veterinary Medicine 45, 61-81.
- Etchechoury, I., Valencia, G.E., Morcillo, N., Sequeira, M.D., Imperiale, B., López, M., Caimi, K., Zumárraga, M.J., Cataldi, A., Romano, M.I., 2010. Molecular typing of *Mycobacterium bovis* isolates in Argentina: first description of a person-to-person transmission case. Zoonoses and Public Health 57, 375-381.
- European Commission (EC), 2013. Working Document on Eradication of Bovine Tuberculosis in the EU (SANCO/10067/2013). https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/animals/docs/diseases_erad_tb_workingdoc2006_en.pdf
- European Commission (EC), 2017. Guidelines for the Union co-funded programmes of eradication, control and surveillance of animal diseases and zoonoses for the years 2018-2020. WORKING DOCUMENT SANTE/2017/10186 rev 1. https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/safety/docs/cff_animal_vetprogs_guidance_progs_erad_2018-2020.pdf
- European Commission (EC), 2019. Reglamento de ejecución (UE) 2019/627 de la comisión de 15 de marzo 2019 por el que se establecen disposiciones prácticas uniformes para la realización de controles oficiales de los productos de origen animal destinados al consumo humano, de conformidad con el Reglamento (UE) 2017/625 del Parlamento Europeo y del Consejo, y por el que se modifica el Reglamento (CE) n.o 2074/2005 de la Comisión en lo que respecta a los controles oficiales.
- European Food Safety Authority Panels (EFSA) on Biological Hazards (BIOHAZ), on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), and on Animal Health and Welfare (AHAW), 2011. Scientific Opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat (swine). EFSA Journal 9, 2351.

- European Food Safety Authority Panel on Animal Health and Welfare (EFSA and AHAW), 2012. Scientific Opinion on the use of a gamma interferon test for the diagnosis of bovine tuberculosis. EFSA Journal 10, 2975.
- European Food Safety Authority Panel on Animal Health and Welfare (EFSA and AHAW), 2013. Scientific Opinion on field trials for bovine tuberculosis vaccination. EFSA Journal 11, 3475.
- European Food Safety Authority Panel on Biological Hazards (EFSA and BIOHAZ) with the contribution of the Panels on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) and Animal Health and Welfare (AHAW), 2013a. Scientific Opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat from sheep and goats. EFSA Journal 11, 3265.
- European Food Safety Authority Panel on Biological Hazards (EFSA and BIOHAZ) with the contribution of the EFSA Panels on Contaminants in the Food Chain (CONTAM) and Animal Health and Welfare (AHAW), 2013b. Scientific Opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat (bovine animals). EFSA Journal 11, 3266.
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC), 2018. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2017. EFSA Journal 16, e05500.
- European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA and ECDC), 2019. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. EFSA Journal 17, e05926.
- Evans, J.T., Smith, E.G., Banerjee, A., Smith, R.M., Dale, J., Innes, J.A., Hunt, D., Tweddell, A., Wood, A., Anderson, C., Hewinson, R.G., Smith, N.H., Hawkey, P., Sonnenberg, P., 2007. Cluster of human tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*: evidence for person-to-person transmission in the UK. Lancet 369, 1270-1276.
- Eves, J.A., 1999. Impact of badger removal on bovine tuberculosis in east County Offaly. Irish. The Veterinary Journal 52, 199-203.
- Fabri, M., Stenger, S., Shin, D., Yuk, J., Liu, P.T., Lee, H., Krutzik, S.R., Schenk, M., Sieling, P.A., Montoya, D., Iyer, S.S., Bruns, H., Lewinsohn, D.M., Bruce, W., Hewison, M., Adams, J.S., Steinmeyer, A., Zügel, U., Jo, E., Bloom, B.R., Modlin, R.L., 2012. Vitamin D Is Required for IFN- γ -Mediated Antimicrobial Activity of Human Macrophages. Science Translational Medicine 3, 104ra102
- Fell, S., Bröckl, S., Büttner, M., Rettinger, A., Zimmermann, P., Straubinger, R.K., 2016. Two alternative DNA extraction methods to improve the detection of *Mycobacterium-tuberculosis*-complex members in cattle and red deer tissue samples. BMC Microbiology 16, 213.
- Fernández-de-Mera, I.G., Vicente, J., Höfle, U., Fons, F.R., 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, 119-126.
- Fernández-de-Mera, I.G., Jaroso, R., Martín-Hernando, M.P., Queirós, J., Carta, T., Ortíz, J.A., Vicente, J., Gortázar, C., 2011. The testing season affects red deer skinfold increase in response to phytohaemagglutinin. Preventive Veterinary Medicine 100, 79-83.
- Fischer, E.A., van Roermund, H.J., Hemerik, L., van Asseldonk, M.A., de Jong, M.C., 2005. Evaluation of surveillance strategies for bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) using an individual based epidemiological model. Preventive Veterinary Medicine 67, 283-301.

- Fischer, J.W., Phillips, G.E., Baasch, D.M., Lavelle, M.J., VerCauteren, K.C., 2011. Modifying elk (*Cervus elaphus*) behavior with electric fencing at established fence-lines to reduce disease transmission potential. *Wildlife Society Bulletin* 35, 9-14.
- Fischer, J.W., Blass, C.R., Walter, W.D., Anderson, C.W., Lavelle, M.J., Hall, W.H., VerCauteren, K.C., 2016. Evaluating a strategy to deliver vaccine to white-tailed deer at a landscape level. *Wildlife Society Bulletin* 40, 394-399.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Organization for Animal Health/World Bank, 2010. Good practices for biosecurity in the pig sector - Issues and options in developing and transition countries. *FAO Animal Production and Health Paper* 169, Roma, IT.
- Ford, E.G., Snead, S.J., Todd, J., Warren, N.G., 1993. Strains of *Mycobacterium terrae* complex which react with DNA probes for *M. tuberculosis* complex. *Journal of Clinical Microbiology* 31, 2805-2806.
- Foullerton, A.G., 1902. A case of tuberculosis in a sheep. *Journal of Comparative Pathology* 15, 102-104.
- Fresco-Taboada, A., Rivalde, M.A., Gortázar, C., Tapia, I., González, I., Venteo, A., Sanz, A., Rueda, P., 2019. A lateral flow assay for the rapid diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in wild boar. *Transboundary and Emerging Diseases* 66, 2175-2179.
- Frothingham, R., Meeker-O'connell, W.A., 1998. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* 144, 1189-1196.
- Galagan, J.E., 2014. Genomic insights into tuberculosis. *Nature Reviews Genetics* 15, 307-320.
- García-Barragán, A., Gutierrez-Pabello, J.A., Alfonso-Silva, E., 2018. Calcitriol increases nitric oxide production and modulates microbicidal capacity against *Mycobacterium bovis* in bovine macrophages. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 59, 17-23.
- García-Bocanegra, I., Pérez 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, e34908.
- García-Castro C., 2007. La inspección del matadero en el diagnóstico de la tuberculosis y cisticercosis bovina. Thesis, doctorate in Department of Hygiene and Food Technology. University León, Spain.
- García-Jiménez, W.L., Salguero, F.J., 2016. Tuberculosis porcina: epidemiología y aspectos clínicos. *Anaporc* 13, 16-19.
- 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., Hermoso de Mendoza, J., 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, 66-75.
- García-Jiménez, W., Fernández-Llario, P., Benítez-Medina, J.M., Cerrato, R., Cuesta, J., García, A., Gonzalves, P., Martínez, R., Risco, D., Salguero, F.J., Serrano, E., Gómez-Gordo, L., Hermoso de Mendoza, J., 2013. Reducing Eurasian wild boar (*Sus scrofa*) population density as a measure for bovine tuberculosis control: Effects in wild boar and sympatric fallow deer (*Dama dama*) population in Central Spain. *Preventive Veterinary Medicine* 110, 435-446.

- 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, 1533-1540.
- García-Marín, J.F., 1992. Public health aspects of *Mycobacterium bovis* in goats. En: Moussa AAM (Ed.) *Proceedings of the International Conference on Animal Tuberculosis in Africa and Middle East*, Cairo, Egypt. The General Organization for Veterinary Services, Cairo, Egypt.
- García-Marín, J.F., Luján, L., Badiola, J.J., 1989. Diagnóstico de tuberculosis ovina. *ITEA- Información Técnica Económica Agraria* 9, 163-165.
- García-Saenz, A., Napp, S., López, 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, 332-337.
- Garnett, B.T., Roper, T.J., Delahay, R.J., 2003. Use of cattle troughs by badgers (*Meles meles*): a potential route for the transmission of bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) to cattle. *Applied Animal Behaviour Science* 80, 1-8.
- 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, e24905.
- Garrido, J.M., Vázquez, P., Molina, E., Plazaola, J.M., Sevilla, I.A., Geijo, M.V., Alonso-Hearn, M., Juste, R.A., 2013. Paratuberculosis vaccination causes only limited cross-reactivity in the skin test for diagnosis of bovine tuberculosis. *PLoS One* 8, e80985.
- Garrido, J.L., Ferreres, J., Gortázar, C., 2019. Las especies cinegéticas españolas en el siglo XXI. https://www.amazon.es/dp/1676220933/ref=cm_sw_r_tw_dp_U_x_XLIfebPE1ZQGN
- Gehring, T.M., VerCauteren, K.C., Provost, M.L., Cellar, A.C., 2011. Utility of livestock-protection dogs for deterring wildlife from cattle farms. *Wildlife Research* 37, 715-721.
- Gershwin, L.J., 2018. Adverse reactions to vaccination. From anaphylaxis to autoimmunity. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 48, 279-290.
- Gherardi, E., 2007. The Concept of Immunity. History and Applications *Immunol. Course Med. Sch. Univ. Pavia*. <http://www-4.unipv.it/offertaformativa/medicina/corso.php?lingua=1&idAttivitaFormativa=202939&modulo=0&anno=>
- Gilot, P., Cocito, C., 1993. Comparative analysis of three sensitins used in cutaneous testing for tuberculosis and paratuberculosis in cattle. *FEMS Microbiology Letters* 110, 307-311.
- Giltsdorf, J., Herold, W., 2001. Air-suspension system. U.S. Patent No. 6,332,624.
- Giltsdorf, M.J., Kaneene, J.B., 2014. The importance of *M. bovis* infection in cervids on the eradication of bovine tuberculosis in the United States. En: *Zoonotic Tuberculosis: Mycobacterium bovis and Other Pathogenic Mycobacteria*, Third Edn. Wiley Blackwell, New Jersey, USA, pp. 263-275.
- Glaser, L., Carstensen, M., Shaw, S., Robbe-Austerman, S., Wunschmann, A., Grear, D., Stuber, T., Thomsen, B., 2016. Descriptive epidemiology and whole genome sequencing analysis for an outbreak of bovine tuberculosis in beef cattle and white-tailed deer in Northwestern Minnesota. *PLoS One* 11, e0145735.

- Gómez-Laguna, J., Carrasco, L., Ramis, G., Quereda, J.J., Gómez, S., Pallarés, F.J., 2010. Use of Real-Time and Classic Polymerase Chain Reaction assays for the diagnosis of porcine tuberculosis in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 22, 123-127.
- Good, M., Clegg, T.A., Costello, E., More, S.J., 2011a. The comparative performance of the single intradermal test and the single intradermal comparative tuberculin test in Irish cattle, using tuberculin PPD combinations of differing potencies. *The Veterinary Journal* 190, e60-e65.
- Good, M., Clegg, T.A., Murphy, F., More, S.J., 2011b. The comparative performance of the single intradermal comparative tuberculin test in Irish cattle, using tuberculin PPD combinations from different manufacturers. *Veterinary Microbiology* 151, 77-84.
- Good, M., Bakker, D., Duignan, A., Collins, D.M., 2018. The history of in vivo tuberculin testing in bovines: Tuberculosis, a "One Health" Issue. *Frontiers in Veterinary Science* 5, 59.
- Gordon, S.V., Bottai, D., Simeone, R., Stinear, T.P., Brosch, R., 2009. Pathogenicity in the tubercle bacillus: molecular and evolutionary determinants. *BioEssays* 31, 378-388.
- Gormley, E., Doyle, M.B., McGill, K., Costello, E., Good, M., Collins, J.D., 2004. The effect of the tuberculin test and the consequences of a delay in blood culture on the sensitivity of a gamma-interferon assay for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 102, 413-20.
- Gormley, E., Doyle, M.B., Fitzsimons, T., McGill, K., Collins, J.D., 2006. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle by use of the gamma-interferon (Bovigam®) assay. *Veterinary Microbiology* 112, 171-179.
- Gormley, E., Doyle, M., Duignan, A., Good, M., More, S.J., Clegg, T.A., 2013. Identification of risk factors associated with disclosure of false positive bovine tuberculosis reactors using the gamma-interferon (IFN γ) assay. *Veterinary Research* 44, 117.
- Gormley, E., Corner, L.A.L., Costello, E., Rodríguez-Campos, S., 2014. Bacteriological diagnosis and molecular strain typing of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae*. *Research in Veterinary Science* 97, S30-S43.
- Gormley, E., Ní Bhuachalla, D., O'Keeffe, J., Murphy, D., Aldwell, F.E., Fitzsimons, T., Stanley, P., Tratalos, J.A., McGrath, G., Fogarty, N., Kenny, K., More, S.J., Messam, L.L., Corner, L.A., 2017. Oral vaccination of free-living badgers (*Meles meles*) with Bacille Calmette Guérin (BCG) vaccine confers protection against tuberculosis. *PLoS One* 12, e0168851.
- Gortázar, C., Herrero, J., Villafuerte, R., Marco, J., 2000. Historical examination of the status of large mammals in Aragón, Spain. *Mammalia* 64, 411-422.
- Gortázar, C., Vicente, J., Samper, S., Garrido, J.M., Fernández-De-Mera, I.G., Gavin, P., Juste, R.A., Martín, C., Acevedo, P., de la Fuente, M., Hofle, U., 2005. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from wild ungulates in south-central Spain. *Veterinary Research* 36, 43-52.
- Gortázar, C., Acevedo, P., Ruiz-Fons, F., Vicente, J., 2006. Disease risks and overabundance of game species. *European Journal of Wildlife Research* 52, 81-87.
- 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 Doñana Biosphere Reserve: the role of wild ungulates as disease reservoirs in the last Iberian lynx strongholds. *PLoS One* 3, e2776.
- 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, 27.

- Gortázar, C., Delahay, R., McDonald, R.A., Boadella, M., Wilson, G.J., Gavier-Wilden., Acevedo, P., 2012. The status of tuberculosis in European wild mammals. *Mammal Review* 42, 193-206.
- 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.
- Gortázar C., Díez-Delgado I., Barasona J.A., Vicente J., de la Fuente J., Boadella M., 2015. The wild side of disease control at the wildlife-livestock-human interface: a review. *Frontier in Veterinary Science* 1, 27.
- 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.
- Government of United Kingdom, 2018. Badger Edge Vaccination Scheme: how to run a vaccination campaign. <https://www.gov.uk/government/publications/badger-edge-vaccination-scheme-2-bevs-2/how-to-run-a-scheme-to-vaccinate-badgers>
- Gowtage-Sequeira, S., Paterson, A., Lyashchenko, K.P., Lesellier, S., Chambers, M.A., 2009. Evaluation of the CervidTB STAT-PAK for the detection of *Mycobacterium bovis* infection in wild deer in Great Britain. *Clinical and Vaccine Immunology* 16, 1449-1452.
- Graham, J., Smith, G.C., Delahay, R.J., Bailey, T., Mc Donald, R.A., Hodgson, D., 2013. Multi-state modelling reveals sex-dependent transmission, progression and severity of tuberculosis in wild badgers. *Epidemiology and Infection* 141, 1429-1436.
- Grant, I.R., Stewart, L.D., 2015. Improved detection of *Mycobacterium bovis* in bovine tissues using immunomagnetic separation approaches. *Methods in Molecular Biology* 1247, 153-161.
- Greenwald, R., Esfandiari, J., Lesellier, S., Houghton, R., Pollock, J., Aagaard, C., Andersen, P., Hewinson, R.G., Chambers, M., Lyashchenko, K., 2003. Improved serodetection of *Mycobacterium bovis* infection in badgers (*Meles meles*) using multiantigen test formats. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 46, 197-203.
- Greenwald, R., Lyashchenko, O., Esfandiari, J., Miller, M., Mikota, S., Olsen, J.H., Ball, R., Dumonceaux, G., Schmitt, D., Moller, T., Payeur, J.B., Harris, B., Sofranko, D., Waters, W.R., Lyashchenko, K.P., 2009. Highly accurate antibody assays for early and rapid detection of tuberculosis in African and Asian elephants. *Clinical and Vaccine Immunology* 16, 605-612.
- Griffin, J.F.T., Hesketh, J.B., Mackintosh, C.G., Shi, Y.E., Buchan, G.S., 1993. BCG vaccination in deer: distinctions between delayed type hypersensitivity and laboratory parameters of immunity. *Immunology and Cell Biology* 71, 559-570.
- Griffin, J.F.T., Mackintosh, C.G., Slobbe, L., Thomson, A.J., Buchan, G.S., 1999. Vaccine protocols to optimise the protective efficacy of BCG. *Tubercle and Lung Disease* 79, 135-143.
- Griffin, J.F.T, Mackintosh, C.G., Rodgers, C.R., 2006. Factors influencing the protective efficacy of a BCG homologous prime-boost vaccination regime against tuberculosis. *Vaccine* 24, 835-845.

- Gupta, U.D., Katoch, V.M., 2009. Animal models of tuberculosis for vaccine development. *Indian Journal of Medical Research* 1, 129.
- Guta, S., Casal, J., Napp, S., Sáez, J.L., García-Saenz, A., Pérez de Val, B., Romero, B., Álvarez, J., Allepuz, A., 2014a. Epidemiological investigation of bovine tuberculosis herd breakdowns in Spain 2009/2011. *PLoS One* 9, e104383.
- Guta, S., Casal, J., García-Saenz, A., Sáez, J.L., Pacios, A., García, P., Napp, S., Allepuz, A., 2014b. Risk factors for bovine tuberculosis persistence in beef herds of Southern and Central Spain. *Preventive Veterinary Medicine*, 115, 173-180.
- Gutiérrez, J.M., 2003. La tuberculosis bovina como zoonosis en la España contemporánea 1850-1950. *Proceeding of International Congress, III Iberoamerican and II Mexican History of Veterinary Medicine*, Mexico City, 2003, 34è.
- Gutiérrez, M., Samper, S., Jiménez, M.S., Van Embden, J.D.A., García-Marín, J.F., Martín, C., 1997. Identification by spoligotyping of a caprine genotype in *Mycobacterium bovis* strains causing human tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 3328-3330.
- Gutiérrez, M., Tellechea, J., García-Marín, J.F., 1998. Evaluation of cellular and serological diagnostic tests for the detection of *Mycobacterium bovis*-infected goats. *Veterinary Microbiology* 62, 281-290.
- Gutiérrez-Cancela, M.M., García-Marín, J.F., 1993. Comparison of Ziehl-Neelsen staining and immunohistochemistry for the detection of *Mycobacterium bovis* in bovine and caprine tuberculous lesions. *Journal of Comparative Pathology* 109, 361-370.
- Haagsma, J., 1986. Potency testing of bovine tuberculins. *Developments in Biological Standardization* 58, 689-694.
- Haddad, N., Ostyn, A., Karoui, C., Masselot, M., Thorel, M.F., Hughes, S.L., Inwald, J., Hewinson, R.G., Durand, B., 2001. Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* strains isolated in France from 1979 to 2000. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 3623-3632.
- Harboe, M., Wiker, H.G., Duncan, J.R., García, M.M., Dukes, T.W., Brooks, B.W., Turcotte, C., Nagai, S., 1990. Protein G-based enzyme-linked immunosorbent assay for anti-MPB70 antibodies in bovine tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* 28, 913-921.
- Hauer, A., Michelet, L., De Cruz, K., Cochard, T., Branger, M., Karoui, C., Henault, S., Biet, F., Boschioli, M.L., 2016. MIRU-VNTR allelic variability depends on *Mycobacterium bovis* clonal group identity. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 45, 165-169.
- Hauer, A., Michelet, L., Cochard, T., Branger, M., Nunez, J., Boschioli, M.L., Biet, F., 2019. Accurate Phylogenetic Relationships Among *Mycobacterium bovis* Strains Circulating in France Based on Whole Genome Sequencing and Single Nucleotide Polymorphism Analysis. *Frontiers in Microbiology* 10, 955.
- Hawn, T.R., Day, T.A., Scriba, T.J., Hatherill, M., Hanekom, W.A., Evans, T.G., Churchyard, G.J., Kublin, J.G., Bekker, L.-G., Self, S.G., 2014. Tuberculosis vaccines and prevention of infection. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 78, 650-671.
- Hermoso de Mendoza, J., Parra, A., Fernández-Llario, P., Alonso, J., Rey, J., Casas, E., Hermoso de Mendoza, E., Cerrato, R., 2003. La tuberculosis y el porcino intensivo: el problema y sus alternativas de control. *Ganadería* 36-43.
- Hermoso de Mendoza, J., Parra, A., Tato, A., Alonso, J.M., Rey, J.M., Peña, J., García-Sánchez, A., Larrasa, J., Teixidó, J., Manzano, G., Cerrato, R., Pereira, G., Fernández-Llario, P., Hermoso de Mendoza, M., 2006. Bovine tuberculosis in wild boar (*Sus scrofa*), red deer (*Cervus elaphus*) and cattle (*Bos taurus*) in a Mediterranean ecosystem (1992-2004). *Preventive Veterinary Medicine* 74, 239-247.

- Hermoso de Mendoza, J., Martínez, R., Benítez, J.M., Balseiro, A., Boinas, F., Botelho, A., Fernández, C., Mínguez, O., Moreno, J.C., Muñoz, M., Romero, B., Vigo, M., 2019. Conclusiones. En: Hermoso de Mendoza Salcedo, J., Benítez Medina, J.M., Martínez Pérez, R., Balseiro Morales, A., Botelho, A. (Eds.), Tuberculosis Animal: Encuentro de La Comunidad Científica y La Administración. I Workshop Ibérico y II Nacional de Investigación En Tuberculosis. Cáceres, 2019. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid, pp. 93-100.
- Hershkovitz, I., Donoghue, H.D., Minnikin, D.E., Besra, G.S., Lee, O.Y.C., Gernaey, A.M., Galili, E., Eshed, V., Greenblatt, C.L., Lemma, E., Bar-Gal, G.K., Spigelman, M., 2008. Detection and Molecular Characterization of 9000-Year-Old *Mycobacterium tuberculosis* from a Neolithic Settlement in the Eastern Mediterranean. PLoS One 3, e3426.
- Hill, B., Satterfield, J., Harris, J., Bjordahl, H., Van Tilburg, M., Morse, J., Chiang, U.C., 2005. Combined content selection and display user interface. U.S. Patent Application 10,836,154.
- Hines, N., Payeur, J.B., Hoffman, L.J., 2006. Comparison of the recovery of *Mycobacterium bovis* isolates using the BACTEC MGIT 960 system, BACTEC 460 system, and Middlebrook 7H10 and 7H11 solid media. The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 18, 243-250.
- Hlavsá, M.C., Moonan, P.K., Cowan, L.S., Navin, T.R., Kammerer, J.S., Morlock, G.P., Crawford, J.T., LoBue, P.A., 2008. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in the United States, 1995-2005. Clinical Infectious Diseases 47, 168-175.
- Hope, J.C., Thom, M.L., McAulay, M., Mead, E., Vordermeier, H.M., Clifford, D., Hewinson, R.G., Villarreal-Ramos, B., 2011. Identification of surrogates and correlates of protection in protective immunity against *Mycobacterium bovis* infection induced in neonatal calves by vaccination with *M. bovis* BCG Pasteur and *M. bovis* BCG Danish. Clinical and Vaccine Immunology 18, 373-379.
- Horcájada-Sánchez, F., Navarro-Castilla, Á., Boadella, M., Barja, I., 2018. Influence of livestock, habitat type, and density of roe deer (*Capreolus capreolus*) on parasitic larvae abundance and infection seroprevalence in wild populations of roe deer from central Iberian Peninsula. Mammal Research 63, 213-222.
- Hughes, M.S., Skuce, R.A., Beck, L.A., Neill, S.D., 1993. Identification of mycobacteria from animals by restriction enzyme analysis and direct DNA cycle sequencing of polymerase chain reaction-amplified 16S rRNA gene sequences. Journal of Clinical Microbiology 31, 3216-3222.
- Hughes, M.S., Ball, N.W., McCarroll, J., Erskine, M., Taylor, M.J., Pollock, J.M., Skuce, R.A., Neill, S.D., 2005. Molecular analyses of mycobacteria other than the *M. tuberculosis* complex isolated from Northern Ireland cattle. Veterinary Microbiology 108, 101-112.
- Humblet, M.F., Boschirolí, M.L., Saegerman, C., 2009. Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: a stratified approach. Veterinary Research 40, 50.
- Hutchings, M.R., Harris, S., 1997. Effects of farm management practices on cattle grazing. Veterinary Research 153, 149-162.
- Infantes-Lorenzo, J.A., Moreno, I., Risalde, M., de los 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.

- Infantes-Lorenzo, J.A., Whitehead, C.E., 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* 5, 189.
- Infantes-Lorenzo, J.A., Davé, 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, 61-69.
- Infantes-Lorenzo, J.A., Moreno, I., Roy, A., Risalde, M.A., Balseiro, A., de Juan, L., Romero, B., Bezos, J., Puentes, E., Akerstedt, J., Tessema, G.T., 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, 70.
- Infantes-Lorenzo J.A., Gortázar C., Domínguez, L., Muñoz-Mendoza, M., Domínguez, M., Balseiro, A., 2020. Serological technique for detecting tuberculosis prevalence in sheep in Atlantic Spain. *Research in Veterinary Science* 129, 96-98.
- I.U.A.T.L.D., 1994. Criteria for discontinuation of vaccination programmes using bacille calmette-guerin (BCG) in countries with a low prevalence of tuberculosis: A statement of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. *Tubercle and Lung Disease* 75, 179-180.
- 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, 285-289.
- Jenkins, A.O., Gormley, E., Gcebe, N., Fosgate, G.T., Conan, A., Aagaard, C., Michel, A.L., Rutten, V., 2018. Cross reactive immune responses in cattle arising from exposure to *Mycobacterium bovis* and non-tuberculous mycobacteria. *Preventive Veterinary Medicine* 152, 16-22.
- Johnson, L.K., Liebana, E., Nunez, A., Spencer, Y., Clifton-Hadley, R., Jahans, K., Ward, A., Barlow, A., Delahay, R., 2008. Histological observations of bovine tuberculosis in lung and lymph node tissues from British deer. *The Veterinary Journal* 175, 409-412.
- Jones, G.J., Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M., 2010. Screening of predicted secreted antigens from *Mycobacterium bovis* identifies potential novel differential diagnostic reagents. *Clinical and Vaccine Immunology* 17, 1344-1348.
- Jones, G.J., Whelan, A., Clifford, D., Coad, M., Vordermeier, H.M., 2012. Improved skin test for differential diagnosis of bovine tuberculosis by the addition of Rv3020c-derived peptides. *Clinical and Vaccine Immunology* 19, 620-622.
- Jones, G.J., Steinbach, S., Sevilla, I.A., Garrido, J.M., Juste, R., Vordermeier, H.M., 2016. Oral vaccination of cattle with heat inactivated *Mycobacterium bovis* does not compromise bovine TB diagnostic tests. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 182, 85-88.
- Jowett, W., 1928. Two cases of tuberculosis in sheep. *Journal of Comparative Pathology* 41, 255-258.
- Judge, P., 2011. Systems and methods for message threat management. U.S. Patent No. 8,069,481.
- Juste, R.A., Alonso-Hearn, M., Garrido, J.M., Abendaño, N., Sevilla, I.A., Gortázar, C., de la Fuente, J., Domínguez, L., 2016a. Increased lytic efficiency of bovine macrophages trained with killed mycobacteria. *PLoS One* 11, e0165607.

- Juste, R.A., Vázquez, P., Geijo, M.V., Serrano, M., Elguezabal, N., Molina, E., Sevilla, I.A., Alonso-Hearn, M., Pérez, V., Garrido, J., 2016b. Paratuberculosis vaccinated cattle lifespan and unspecific protection, Proceedings of the 13th International Colloquium on Paratuberculosis, Nantes, France, 20th-24th June 2016 pp. 0-01.12.
- Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., van Agterveld, M., Soolingen, D.v., Kuijper, S., Buschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M., van Embden, J., 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology* 35, 907-914.
- Kaneene, J.B., Bruning-Fann, C.S., Granger, L.M., Miller, R., Porter-Spalding, B.A., 2002. Environmental and farm management factors associated with tuberculosis on cattle farms in northeastern Michigan. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 221, 837-42.
- Kaneene, J.B., Miller, R., Steele, J.H., Thoen, C.O., 2014. Preventing and controlling zoonotic tuberculosis: a One Health approach. *Veterinaria Italiana* 50, 7-22.
- Kang, S.S., Byeon, H.S., Ku, B.K., Kim, S.W., Kim, J., Woo, J., Ahn, B., Kim, S., Monoldorova, S., Park, C.H., Cho, S.N., Jeon, B.Y., 2016. Seroprevalence of tuberculosis in domesticated elk (*Cervus canadensis*) in Korea. *Research in Veterinary Science* 107, 228-232.
- Kao, R.R., Roberts, M.G., Ryan, T.J., 1997. A model of bovine tuberculosis control in domesticated cattle herds. *Proceedings. Biological Sciences* 264, 1069-1076.
- Karhu, R.R., Anderson, S.H., 2006. The effect of high-tensile electric fence designs on big-game and livestock movements. *Wildlife Society Bulletin* 34, 293-299.
- Kasempimolporn, S., Areekul, P., Thaveekarn, W., Sutthisri, R., Boonchang, S., Sawangvaree, A., Sitprija, V., 2019. Application of transdermal patches with new skin test reagents for detection of latent tuberculosis. *Journal of Medical Microbiology*, 68.
- Kean, J.M., Barlow, N.D., Hickling, G.J., 1999. Evaluating potential sources of bovine tuberculosis infection in a New Zealand cattle herd. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 42, 101-106.
- Keck, N., Boschiroli, M.L., Smyej, F., Vogler, V., Moyon, J.L., Desvaux, S., 2018. Successful application of the gamma-interferon assay in a bovine tuberculosis eradication program: the French bullfighting herd experience. *Frontiers in Veterinary Science* 5, 27.
- Kennedy, A.E., Da Silva, A.T., Byrne, N., Govender, R., MacSharry, J., O'Mahony, J., Sayers, R.G., 2014. The single intradermal cervical comparative test interferes with Johne's disease ELISA diagnostics. *Frontiers in Immunology* 5, 564.
- King, H.C., Khera-Butler, T., James, P., Oakley, B.B., Erenso, G., Aseffa, A., Knight, R., Wellington, E.M., Courtenay, O., 2017. Environmental reservoirs of pathogenic mycobacteria across the Ethiopian biogeographical landscape. *PLoS One* 12, e0173811.
- Kjærgaard, J., Birk, N.M., Nissen, T.N., Thøstesen, L.M., Pihl, G.T., Benn, C.S., Jeppesen, D.L., Pryds, O., Kofoed, P.E., Aaby, P., Greisen, G., Stensballe, L.G., 2016. Nonspecific effect of BCG vaccination at birth on early childhood infections: a randomized, clinical multicenter trial. *Pediatric Research* 80, 681-685.
- Kleinnijenhuis, J., Quintin, J., Preijers, F., Benn, C.S., Joosten, L.A.B., Jacobs, C., van Loenhout, J., Xavier, R.J., Aaby, P., van der Meer, J.W.M., Crevel, R. van, Netea, M.G., 2014. Long-lasting effects of BCG vaccination on both heterologous Th1/Th17 responses and innate trained immunity. *Journal of Innate Immunity* 6, 152.

- Knobel, D.L., Liebenberg, A., Toit, J.T.D., 2003. Seroconversion in captive African wild dogs (*Lycaon pictus*) following administration of a chicken head bait/SAG-2 oral rabies vaccine combination. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 70, 73-77.
- Kohler, H., Gyra, H., Zimmer, K., Drager, K.G., Burkert, B., Lemser, B., Hausleithner, D., Cubler, K., Klawonn, W., Hess, R.G., 2001. Immune reactions in cattle after immunization with a *Mycobacterium paratuberculosis* vaccine and implications for the diagnosis of *M. paratuberculosis* and *M. bovis* infections. *Journal of Veterinary Medicine. Series B* 48, 185-195.
- Krasnow, I., Wayne, L.G., 1969. Comparison of methods for tuberculosis bacteriology. *Applied and Environmental Microbiology* 18, 915-917.
- Kukielka, E., Barasona, J.A., Cowie, C.E., Drewe, J.A., Gortázar, 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, 213-221.
- Lahuerta-Marín, A., Milne, M.G., McNair, J., Skuce, R.A., McBride, S.H., Menzies, F.D., McDowell, S.J.W., Byrne, A.W., Handel, I.G., de C Bronsvooort, B.M., 2018. Bayesian latent class estimation of sensitivity and specificity parameters of diagnostic tests for bovine tuberculosis in chronically infected herds in Northern Ireland. *The Veterinary Journal* 238, 15-21.
- Lambert, S., Hars, J., Réveillaud, E., Moyen, J.L., Gares, H., Rambaud, T., Gueneau, E., Faure, E., Boschirollo, M.L., Richomme, C., 2017. Host status of wild roe deer in bovine tuberculosis endemic areas. *European Journal of Wildlife Research* 63, 15.
- Lari, N., Rindi, L., Cristofani, R., Rastogi, N., Tortoli, E., Garzelli, C., 2009. Association of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates of BOVIS and Central Asian (CAS) genotypic lineages with extrapulmonary disease. *Clinical Microbiology and Infection* 15, 538-543.
- Lauzi, S., Pasotto, D., Amadori, M., Archetti, I.L., Poli, G., Bonizzi, L., 2000. Evaluation of the specificity of the gamma-interferon test in Italian bovine tuberculosis-free herds. *The Veterinary Journal* 160, 17-24.
- Lawn, S.D., Wood, R., Wilkinson, R.J., 2011. Changing concepts of "latent tuberculosis infection" in patients living with HIV infection. *Clinical and Developmental Immunology* 2011.
- Leng, J., Ding, Y., Shou, C., Wu, Z., Zhuo, G., Wang, K., Shen, J., Huang, S., 2014. Development of a novel anti ESAT-6 monoclonal antibody for screening of *Mycobacterium tuberculosis*. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 7, 4238-4243.
- Lepper, A.W.D., Newton-Tabrett, D.A., Corner, L.A., Carpenter, M.T., Scanlan, W.A., Williams, O.J., Helwig, D.M., 1977. The use of bovine PPD tuberculin in the single caudal fold test to detect tuberculosis in beef cattle. *Aust. The Veterinary Journal* 53, 208-213.
- Lesellier, S., Palmer, S., Dalley, D.J., Davé, D., Johnson, L., Hewinson, R.G., Chambers, M.A., 2006. The safety and immunogenicity of Bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccine in European badgers (*Meles meles*). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 112, 24-37.
- Lesellier, S., Palmer, S., Gowtage-Sequiera, S., Ashford, R., Dalley, D., Davé, D., Weyer, U., Salguero, F.J., Nunez, A., Crawshaw, T., Corner, L.A., Hewinson, R.G., Chambers, M.A., 2011. Protection of Eurasian badgers (*Meles meles*) from tuberculosis after intramuscular vaccination with different doses of BCG. *Vaccine* 29, 3782-3790.

- Leth, C., Varadharajan, A., Mester, P., Fischaleck, M., Rossmannith, P., Schmoll, F., Fink, M., 2017. Matrixlysis, an improved sample preparation method for recovery of Mycobacteria from animal tissue material. PLoS One 12, e0181157.
- Li, Q., Yu, H., Zhang, Y., Wang, B., Jiang, W., Da, Z., Xian, Q., Wang, Y., Liu, X., Zhu, B., 2011. Immunogenicity and protective efficacy of a fusion protein vaccine consisting of antigen Ag85B and HspX against *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. Scandinavian Journal of Immunology 73, 568-576.
- Liébana, E., Aranaz, A., Mateos, A., Vilafranca, M., Gómez-Mampaso, E., Tercero, J.C., Alemany, J., Suárez, G., Domingo, M., Domínguez, L., 1995. Simple and rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms in bovine tissue samples by PCR. Journal of Clinical Microbiology 33, 33-36.
- Liébana, E., Aranaz, A., Urquía, J.J., Mateos, A., Domínguez, L., 1998. Evaluation of the gamma-interferon assay for eradication of tuberculosis in a goat herd. Australian Veterinary Journal 76, 50-53.
- Liébana, E., Johnson, L., Gough, J., Durr, P., Jahans, K., Clifton-Hadley, R., Spencer, Y., Hewinson, R.G., Downs, S.H., 2008. Pathology of naturally occurring bovine tuberculosis in England and Wales. The Veterinary Journal 176, 354-360.
- Lilenbaum, W., Schettini, J.C., Souza, G.N., Ribeiro, E.R., Moreira, E.C., Fonseca, L.S., 1999. Comparison between a gamma-IFN assay and intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis in field trials in Brazil. Journal of Veterinary Medicine. Series B 46, 353-358.
- Lilenbaum, W., Marassi, C.D., Vargas, R., Medeiros, L., Oelemann, W.M.R., Fonseca L.S., 2009. Occurrence of false-positive results in three paratuberculosis - ELISAs performed in a tuberculous herd. Veterinary Research Communications, 33, 693-699.
- Lin, R., 2016. Crosstalk between vitamin D metabolism, VDR signalling, and innate immunity. BioMed Research International 2016, 1375858.
- Lipiec, M., Radulski, Ł., Szulowski, K., 2019. A case of bovine tuberculosis in pigs in Poland - a country free from the disease. Annals of Agricultural and Environmental Medicine 26, 29-32.
- Liu, S., Guo, S., Wang, C., Shao, M., Zhang, X., Guo, Y., Gong, Q., 2007. A novel fusion protein-based indirect enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of bovine tuberculosis. Tuberculosis (Edinburgh, Scotland) 87, 212-217.
- Liu, R., Duvvuri, V., Wu, J., 2008. Spread pattern formation of H5N1-avian influenza and its implications for control strategies. Mathematical Modelling of Natural Phenomena 3, 161-179.
- López, V., González-Barrio, D., Lima-Barbero, J.F., Ortiz, J.A., Domínguez, L., Juste, R., Garrido, J.M., Sevilla, I.A., Alberdi, P., de la Fuente, J., Gortázar, C., 2016. Oral administration of heat-inactivated *Mycobacterium bovis* reduces the response of farmed red deer to avian and bovine tuberculin. Veterinary Immunology and Immunopathology 172, 21-25.
- López-Valencia, G., Rentería-Evangelista, T., Williams, Jde.J., Licea-Navarro, A., Mora-Valle, A.L., Medina-Basulto, G., 2010. Field evaluation of the protective efficacy of *Mycobacterium bovis* BCG vaccine against bovine tuberculosis. Research in Veterinary Science 88, 44-49.
- Lorente-Leal, V., Liandris, E., Castellanos, E., Bezos, J., Domínguez, L., de Juan, L., Romero, B., 2019. Validation of a Real-Time PCR for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex members in bovine tissue samples. Frontiers in Veterinary Science 6, 61.
- Luca, S., Mihaescu, T., 2013. History of BCG Vaccine. Mædica 8, 53-58.

- Lyashchenko, K.P., Singh, M., Colangeli, R., Gennaro, M.L., 2000. A multi-antigen print immunoassay for the development of serological diagnosis of infectious diseases. *Journal of Immunological Methods* 242, 91-100.
- Lyashchenko, K.P., Wiker, H.G., Harboe, M., McNair, J., Komissarenko, S.V., Pollock, J.M., 2001. Novel monoclonal antibodies against major antigens of *Mycobacterium bovis*. *Scandinavian Journal of Immunology* 53, 498-502.
- Lyashchenko, K.P., Greenwald, R., Esfandiari, J., Chambers, M.A., Vicente, J., Gortázar, C., Santos, N., Correia-Neves, M., Buddle, B.M., Jackson, R., O'Brien, D.J., Schmitt, S., Palmer, M.V., Delahay, R.J., Waters, W.R., 2008. Animal-side serologic assay for rapid detection of *Mycobacterium bovis* infection in multiple species of free-ranging wildlife. *Veterinary Microbiology* 132, 283-292.
- Maas, M., van Kooten, P.J.S., Schreuder, J., Morar, D., Tijhaar, E., Michel, A.L., Rutten, V.P.M.G., 2012. Development of a lion-specific interferon-gamma assay. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 149, 292-297.
- Maathuis, F.J., 2009. Physiological functions of mineral macronutrients. *Current Opinion in Plant Biology* 12, 250-258.
- Mackay, C.R., Beya, M.F., Matzinger, P., 1989. Gamma/delta T cells express a unique surface molecule appearing late during thymic development. *European Journal of Immunology* 19, 1477-1483.
- Mackintosh, C.G., Labes, R.E., Griffin, J.F., 2005. The effect of Johne's vaccination on tuberculin testing in farmed red deer (*Cervus elaphus*). *New Zealand Veterinary Journal* 53, 216-222.
- Maes, M., Gimenez, J.F., D'Alessandro, A., de Waard, J.H., 2011. The stability of human, bovine and avian tuberculin purified protein derivative (PPD). *The Journal of Infection in Developing Countries* 5, 781-785.
- Malone, F.E., Wilson, E.C., Pollock, J.M., Skuce, R.A., 2003. Investigations into an outbreak of tuberculosis in a flock of sheep in contact with tuberculosis cattle. *Journal of Veterinary Medicine. Series B* 50, 500-504.
- MAPA, 2017. PATUBES Plan de Actuación sobre Tuberculosis en Especies Silvestres. https://www.mapa.gob.es/gl/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/pa-tubes2017_3_tcm37-378321.pdf
- MAPA, 2018. El sector de la carne de cerdo en cifras: Principales Indicadores Económicos 2018. https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/estadisticas/indicadoreseconomicos-sectorporcinoano2018_tcm30-379728.pdf
- MAPA, 2019a. Programa Nacional de Erradicación de Tuberculosis Bovina presentado por España para el año 2019. https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/programatb2019verdefinitiva_tcm30-500265.pdf
- MAPA, 2019b. Manual de Procedimiento Sanitario: Realización de las pruebas de intradermotuberculinización y gamma-interferón. https://www.visavet.es/data/mapa/manual_procedimiento_IDTB_IFN_2019.pdf
- MAPA, 2019c. Encuestas ganaderas, datos de ganado ovino y caprino. <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/ganaderia/encuestas-ganaderas/>
- MAPA, 2020. Disponible en: https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/sanidad-animal-higiene-ganadera/pnetb_2020final_tcm30-523317.PDF

- MAPAMA y VISAVET, 2017. Manual de procedimiento para la toma y envío de muestras para el cultivo microbiológico y diagnóstico de tuberculosis. En: Manuales de Procedimiento del Programa Nacional de Erradicación de Enfermedades. Second Edn. Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (MAPAMA) y Universidad Complutense (UCM).
- MAPA y VISAVET-UCM, 2018. Manual de detección de animales infectados anérgicos en explotaciones T2, de riesgo o con antecedentes de tuberculosis. En: Manuales de Procedimiento del Programa Nacional de Erradicación de Enfermedades. First Edn. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET). Universidad Complutense (UCM).
- Marassi, C., Almeida, C., Pinheiro, S., Vasconcellos, S., Lilenbaum, W., 2009. The use of MPB70-ELISA for the diagnosis of caprine tuberculosis in Brazil. *Veterinary Research Communications* 33, 937-943.
- Marassi, C.D., Medeiros, L., Lilenbaum, W., 2010. The use of a Gamma-Interferon assay to confirm a diagnosis of bovine tuberculosis in Brazil. *Acta Tropica* 113, 199-201.
- Martín-Atance, P., León-Vizcaíno, L., Palomares, F., Revilla, E., González-Candela, M., Calzada, J., Cubero-Pablo, M.J., Delibes, M., 2006. Antibodies to *Mycobacterium bovis* in wild carnivores from Doñana National Park (Spain). *Journal of Wildlife Diseases* 42, 704-708.
- Martínez-Jauregui, M., Herruzo, A.C., 2014. A note on the effectiveness of incorporating management objectives with ecological variables when modeling red deer abundance. *European Journal of Wildlife Research*, 60, 511-517.
- Martini, M., Besozzi, G., Barberis, I., 2018. The never-ending story of the fight against tuberculosis: from Koch's bacillus to global control programs. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene* 59, E241-E247.
- Maue, A.C., Waters, W.R., Palmer, M.V., Nonnecke, B.J., Minion, F.C., Brown, W.C., Norimine, J., Foote, M.R., Scherer, C.F., Estes, D.M., 2007. An ESAT-6:CFP10 DNA vaccine administered in conjunction with *Mycobacterium bovis* BCG confers protection to cattle challenged with virulent *M. bovis*. *Vaccine* 25, 4735-4746.
- McAinsh, M.R., Pittman, J.K., 2009. Shaping the calcium signature. *The New phytologist* 181, 275-294.
- McCallan, L., Brooks, C., Couzens, C., Young, F., McNair, J., Byrne, A.W., 2017. Assessment of serological tests for diagnosis of bovine tuberculosis. *Veterinary Record* 181, 90.
- McCorry, T.P., McCormick, C.M., Hughes, M.S., Pollock, J.M., Neill, S.D., 2004. *Mycobacterium nonchromogenicum* in nasal mucus from cattle in a herd infected with bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology* 99, 281-285.
- McNair, J., Welsh, M.D., Pollock, J.M., 2007. The immunology of bovine tuberculosis and progression toward improved disease control strategies. *Vaccine*, 25, 5504-5511.
- McShane, H., 2009. Vaccine strategies against tuberculosis. *Swiss Medical Weekly* 139, 156-160.
- Mentaberre, G., Romero, B., de Juan, L., Navarro-González, N., Velarde, R., Mateos, A., Marco, I., Olivé-Boix, X., Domínguez, L., Lavín, S., Serrano, E., 2014. Long-term assessment of wild boar harvesting and cattle removal for bovine tuberculosis control in free ranging populations. *PLoS One* 9, e88824.
- Menzies, F.D., Neill, S.D., 2000. Cattle-to-cattle transmission of bovine tuberculosis. *The Veterinary Journal* 160, 92-106.

- Messina, N.L., Zimmermann, P., Curtis, N., 2019. The impact of vaccines on heterologous adaptive immunity. *Clinical Microbiology and Infection* 25, 1484-1493.
- Michel, A.L., 2008. *Mycobacterium fortuitum* infection interference with *Mycobacterium bovis* diagnostics: natural infection cases and a pilot experimental infection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 20, 501-503.
- Michel, A.L., Cooper, D., Jooste, J., de Klerk, L.M., Jolles, A., 2011. Approaches towards optimising the gamma interferon assay for diagnosing *Mycobacterium bovis* infection in African buffalo (*Syncerus caffer*). *Preventive Veterinary Medicine* 98, 142-151.
- Michelet, L., de Cruz, K., Karoui, C., Tambosco, J., Moyen, J.L., Henault, S., Boschirol, M.L., 2018. Second line molecular diagnosis for bovine tuberculosis to improve diagnostic schemes. *PLoS One* 13, e0207614.
- Miller, J., Jenny, A., Rhyan, J., Saari D., D.S., 1997. Detection of *Mycobacterium bovis* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of cattle and elk by amplification of an IS6110 sequence specific for *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 9, 244-249.
- Miller, M.A., Gortázar, C., Roos, E.O., Rivalde, M.A., Johnathan-Lee, A., Sridhara, A.A., Lyashchenko, K.P., 2019. Serological reactivity to MPB83 and CFP10/ESAT-6 antigens in three suid hosts of *Mycobacterium bovis* infection. *Veterinary Microbiology* 235, 285-288.
- Miller, R.A., Kaneene, J.B., Fitzgerald, S.D., Schmitt, S.M., 2003. Evaluation of the influence of supplemental feeding of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) on the prevalence of bovine tuberculosis in the Michigan wild deer population. *Journal of Wildlife Diseases* 39, 84-95.
- Miller, R.S., Sweeney, S.J., 2013. *Mycobacterium bovis* (bovine tuberculosis) infection in North American wildlife: current status and opportunities for mitigation of risks of further infection in wildlife populations. *Epidemiology and Infection* 141, 1357-1370.
- Millington, K.A., Fortune, S.M., Low, J., Garces, A., Hingley-Wilson, S.M., Wickremasinghe, M., Kon, O.M., Lalvani, A., 2011. Rv3615c is a highly immunodominant RD1 (Region of Difference 1)-dependent secreted antigen specific for *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 5730-5735.
- Milner, J.M., Bonenfant, C., Mysterud, A.T.L.E., Gaillard, J.M., Csányi, S., Stenseth, N.C., 2006. Temporal and spatial development of red deer harvesting in Europe: biological and cultural factors. *Journal of Applied Ecology* 43, 721-734.
- Mishra, A., Singhal, A., Chauhan, D.S., Katoch, V.M., Srivastava, K., Thakral, S.S., Bharadwaj, S.S., Sreenivas, V., Prasad, H.K., 2005. Direct detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* in bovine samples by a novel nested PCR assay: Correlation with conventional techniques. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 5670-5678.
- Mon, M.L., Moyano, R.D., Viale, M.N., Colombatti-Olivieri, M.A., Gamieta, I.J., Montenegro, V.N., Alonso, B., Paz-Santangelo, M., L., Singh, M., Duran, R., Romano, M.I., 2014. Evaluation of cocktails with recombinant proteins of *Mycobacterium bovis* for a specific diagnosis of bovine tuberculosis. *BioMed Research International* 2014, 140829.
- Monaghan, M.L., Doherty, M.L., Collins, J.D., Kazda, J.F., Quinn, P.J., 1994. The tuberculin test. *Veterinary Microbiology* 40, 111-124.
- Moradi, J., Mosavari, N., Ebrahimi, M., Arefpajohi, R., Tebianian, M., 2015. Evaluation of *Mycobacterium tuberculosis* early secreted antigenic target 6 recombinant protein as a diagnostic marker in skin test. *Osong Public Health and Research Perspectives* 6, 34-38.

- Müller, B., Dürr, S., Alonso, S., Hattendorf, J., Laise, C.J.M., Parsons, S.D.C., van Helden, P.D., Zinsstag, J., 2013. Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans. *Emerging Infectious Diseases* 19, 899-908.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51, 263-273.
- Munroe, F.A., Dohoo, I.R., McNab, W.B., 2000. Estimates of within-herd incidence rates of *Mycobacterium bovis* in Canadian cattle and cervids between 1985 and 1994. *Preventive Veterinary Medicine* 45, 247-256.
- Muñoz-Mendoza M., 2017. Tuberculosis en ovino. *Tierras de Ovino* 19, 52-55.
- Muñoz-Mendoza, M., de Juan, L., Menéndez, S., Ocampo, A., Mourelo, J., Sáez, J.L., Domínguez, L., Gortázar, C., García-Marín, J.F., Balseiro, A., 2012. Tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium caprae* in sheep. *The Veterinary Journal* 191, 267-269.
- 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.
- 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, 635-646.
- Murphy, D., Corner, L.A.L., Gormley, E., 2008. Adverse reactions to *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guérin (BCG) vaccination against tuberculosis in humans, veterinary animals and wildlife species. *Tuberculosis* 88, 344-357.
- Murphy, D., Costello, E., Aldwell, F.E., Lesellier, S., Chambers, M.A., Fitzsimons, T., Corner, L.A., Gormley, E., 2014. Oral vaccination of badgers (*Meles meles*) against tuberculosis: comparison of the protection generated by BCG vaccine strains Pasteur and Danish. *The Veterinary Journal* 200, 362-367.
- Muwonge, A., Johansen, T.B., Vigdis, E., Godfroid, J., Olea-Popelka, F., Biffa, D., Skjerve, E., Djonne, B., 2012. *Mycobacterium bovis* infections in slaughter pigs in Mubende district, Uganda: a public health concern. *BMC Veterinary Research* 8, 168.
- Mysterud, A., 2010. Still walking on the wild side? Management actions as steps towards 'semi-domestication' of hunted ungulates. *Journal of Applied Ecology* 47, 920-925.
- Napp, S., Allepuz, A., Mercader, I., Nofrarias, M., López-Soria, S., Domingo, M., Romero, B., Bezos, J., Pérez de Val, B., 2013. Evidence of goats acting as domestic reservoirs of bovine tuberculosis. *Veterinary Record* 172, 663.
- 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, 1-9.
- Naranjo-Lucena, A., Garza-Cuartero, L., Mulcahy, G., Zintl, A., 2017. The immunoregulatory effects of co-infection with *Fasciola hepatica*: From bovine tuberculosis to Johne's disease. *The Veterinary Journal* 222, 9-16.
- Narayanan, S., 2004. Molecular epidemiology of tuberculosis. *The Indian Journal of Medical Research* 120, 233-247.

- Naugle, A.L., Schoenbaum, M., Hench, C.W., Henderson, O.L., Shere, J., 2014. Bovine tuberculosis eradication in the United States. En: *Zoonotic Tuberculosis: Mycobacterium bovis and Other Pathogenic Mycobacteria*, Third Edn. John Wiley & Sons, Inc, Chichester, UK, pp. 235-51.
- Navarro, Y., Romero, B., Bouza, E., Domínguez, L., de Juan, L., García-de-Viedma, D., 2016. Detailed chronological analysis of microevolution events in herds infected persistently by *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Microbiology* 183, 97-102.
- Neill, S.D., Bryson, D.G., Pollock, J.M., 2001. Pathogenesis of tuberculosis in cattle. *Tuberculosis* 81, 79-86.
- Nelson, C.D., Reinhardt, T.A., Thacker, T.C., Beitz, D.C., Lippolis, J.D., 2010. Modulation of the bovine innate immune response by production of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 in bovine monocytes. *Journal of Dairy Science* 93, 1041-1049.
- Nelson, C.D., Nonnecke, B.J., Reinhardt, T.A., Waters, W.R., Beitz, D.C., Lippolis, J.D., 2011. Regulation of *Mycobacterium*-specific mononuclear cell responses by 25-Hydroxyvitamin D3. *PLoS One* 6, e21674.
- Netea, M.G., Quintin, J., van der Meer, J.W.M., 2011. Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell Host Microbe* 9, 355-61.
- Nettleton, P., Russell, G., 2017. Update on infectious bovine rhinotracheitis. *In practice* 39, 255-272.
- Nielsen, S.S., Grohn, Y.T., Quaas, R.L., Agger, J.F., 2002. Paratuberculosis in dairy cattle: variation of the antibody response in offspring attributable to the dam. *Journal of Dairy Science* 85, 406-412.
- Nieuwenhuizen, N.E., Kaufmann, S.H.E., 2018. Next-Generation Vaccines Based on Bacille Calmette-Guérin. *Frontiers in immunology* 9, 121.
- Nol, P., Palmer, M.V., Waters, W.R., Aldwell, F.E., Buddle, B.M., Triantis, J.M., Linke, L.M., Phillips, G.E., Thacker, T.C., Rhyan, J.C., Dunbar, M.R., 2008. Efficacy of oral and parenteral routes of *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin vaccination against experimental bovine tuberculosis in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*): a feasibility study. *Journal of Wildlife Diseases* 44, 247-259.
- Nol, P., Lyashchenko, K.P., Greenwald, R., Esfandiari, J., Waters, W.R., Palmer, M.V., Nonnecke, B.J., Keefe, T.J., Thacker, T.C., Rhyan, J.C., Aldwell, F.E., 2009. Humoral immune responses of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) to *Mycobacterium bovis* BCG vaccination and experimental challenge with *M. bovis*. *Clinical and Vaccine Immunology* 16, 323-329.
- Nol, P., Rhyan, J.C., Robbe-Austerman, S., McCollum, M.P., Rigg, T.D., Saklou, N.T., Salman, M.D., 2013. The potential for transmission of BCG from orally vaccinated white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) to cattle (*Bos taurus*) through a contaminated environment: experimental findings. *PLoS One* 8, e60257.
- Nol, P., Robbe-Austerman, S., Rhyan, J.C., McCollum, M.P., Triantis, J.M., Beltrán-Beck, B., Salman, M.D., 2016. Determining the persistence of *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin Danish in select tissues of orally vaccinated feral swine (*Sus scrofa* spp.). *Research in Veterinary Science* 104, 50-52.
- Nol, P., Wehtje, M.E., Bowen, R.A., Robbe-Austerman, S., Thacker, T.C., Lantz, K., Rhyan, J.C., Baeten, L.A., Juste, R.A., Sevilla, I.A., Gortázar, C., Vicente, J., 2020. Effects of inactivated *Mycobacterium bovis* vaccination on Molokai-origin wild pigs experimentally infected with virulent *M. bovis*. *Pathogens* 7, 9.

- Nugent, G., Gortázar, C., Knowles, G., 2015. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* in wild deer and feral pigs and their roles in the establishment and spread of bovine tuberculosis in New Zealand wildlife. *New Zealand Veterinary Journal* 63, 54-67.
- Nugent, G., Yockney, I.J., Whitford, E.J., Cross, M.L., Aldwell, F.E., Buddle, B.M., 2016. Field trial of an aerially-distributed tuberculosis vaccine in a low-density wildlife population of Brushtail Possums (*Trichosurus vulpecula*). *PLoS One* 11, e0167144.
- Nugent, G., Yockney, I.J., Whitford, J., Aldwell, F.E., Buddle, B.M., 2017. Efficacy of oral BCG vaccination in protecting free-ranging cattle from natural infection by *Mycobacterium bovis*. *Veterinary Microbiology* 208, 181-189.
- Nugent, G., Yockney, I.J., Cross, M.L., Buddle, B.M., 2018. Low-dose BCG vaccination protects free-ranging cattle against naturally-acquired bovine tuberculosis. *Vaccine* 36, 7338-7344.
- Nuñez-García, J., Downs, S.H., Parry, J.E., Abernethy, D.A., Broughan, J.M., Cameron, A.R., Cook, A.J., de la Rúa-Domenech, R., Goodchild, A.V., Gunn, J., More, S.J., Rhodes, S., Rolfe, S., Sharp, M., Upton, P.A., Vordermeier, H.M., Watson, E., Welsh, M., Whelan, A.O., Woolliams, J.A., Clifton-Hadley, R.S., Greiner, M., 2018. Meta-analyses of the sensitivity and specificity of ante-mortem and post-mortem diagnostic tests for bovine tuberculosis in the UK and Ireland. *Preventive Veterinary Medicine* 153, 94-107.
- O'Brien, D.J., Schmitt, S.M., Fierke, J.S., Hogle, S.A., Winterstein, S.R., Cooley, T.M., Moritz, W.E., Diegel, K.L., Fitzgerald, S.D., Berry, D.E., Kaneene, J.B., 2002. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* in free-ranging white-tailed deer, Michigan, USA, 1995-2000. *Preventive Veterinary Medicine* 54, 47-63.
- O'Brien, D.J., Schmitt, S.M., Berry, D.E., Fitzgerald, S.D., Lyon, T.J., Vanneste, J.R., Cooley, T.M., Hogle, S.A., Fierke, J.S., 2008. Estimating the true prevalence of *Mycobacterium bovis* in free-ranging elk in Michigan. *Journal of wildlife diseases* 44, 802-810.
- O'Brien, D.J., Schmitt, S.M., Fitzgerald, S.D., Berry, D.E., 2011a. Management of bovine tuberculosis in Michigan wildlife: Current status and near term prospects. *Veterinary Microbiology* 151, 179-187.
- O'Brien, D.J., Schmitt, S.M., Rudolph, B.A., Nugent, G., 2011b. Recent advances in the management of bovine tuberculosis in free-ranging wildlife. *Veterinary Microbiology* 15, 23-33.
- O'Brien, A., Whelan, C., Clarke, J.B., Hayton, A., Watt, N.J., Harkiss, G.D., 2017. Serological analysis of tuberculosis in goats by use of the Enferplex Caprine TB Multiplex Test. *Clinical and Vaccine Immunology* 24, e00518- e00516.
- O'Connor, C., Haydon, D.T., Kao, R.R., 2012. An ecological and comparative perspective on the control of bovine tuberculosis in Great Britain and Republic of Ireland. *Preventive Veterinary Medicine* 104, 185-197.
- O'Garra, A., Redford, P.S., McNab, F.W., Bloom, C.I., Wilkinson, R.J., Berry, M.P.R., 2013. The immune response in tuberculosis, annual review of immunology 31. 475-527.
- OIE, 2013. World Organisation for Animal Health. Rinderpest Portal. <https://www.oie.int/en/for-the-media/rinderpest/>
- OIE, 2018. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, Eight Edn. Office International des Epizooties, Paris, France. <https://www.oie.int/es/normas/manual-terrestre/>
- OIE, 2019. World Organisation for Animal Health. Terrestrial Animal Health Code. <https://www.oie.int/es/normas/codigo-terrestre/>

- Okafor, C.C., Grooms, D.L., Bolin, S.R., Averill, J.J., Kaneene, J.B., 2014. Evaluation of the interferon- γ assay on blood collected at exsanguination of cattle under field conditions for surveillance of bovine tuberculosis. *Transboundary and Emerging Diseases* 61, e68-e75.
- Olea-Popelka, F.J., Costello, E., White, P., McGrath, G., Collins, J.D., O'Keeffe, J., Kelton, D.F., Berke, O., More, S., Martin, S.W., 2008. Risk factors for disclosure of additional tuberculous cattle in attested-clear herds that had one animal with a confirmed lesion of tuberculosis at slaughter during 2003 in Ireland. *Preventive Veterinary Medicine* 85, 81-91.
- Olea-Popelka, F., Muwonge, A., Perera, A., Dean, A.S., Mumford, E., Erlacher-Vindel, E., Forcella, S., Silk, B.J., Ditiu, L., El Idrissi, A., Raviglione, M., Cosivi, O., LoBue, P., Fujiwara, P.I., 2016. Zoonotic tuberculosis in human beings caused by *Mycobacterium bovis*—a call for action. *The Lancet. Infectious diseases* 17, e21-e25.
- Olmstead, A.L., Rhode, P.W., 2004. An Impossible Undertaking: The eradication of bovine tuberculosis in the United States. *The Journal of Economic History* 64, 734-772.
- Organización Mundial de la Salud (OMS), 2019. Informe mundial sobre la tuberculosis 2019. Disponible en línea: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/329368/9789241565714-eng.pdf?ua=1>, versión completa en inglés.
- Organización Mundial de la Salud (OMS), Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Organización Mundial de Sanidad Animal, Unión Internacional contra la Tuberculosis y Enfermedades Respiratorias, 2017. Hoja de ruta contra la tuberculosis zoonótica. Disponible en línea: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259231/9789243513041-spa.pdf?sequence=1>, 1-24.
- Pai, M., Riley, L.W., Colford, J.M., 2004. Interferon-gamma assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systematic review. *The Lancet. Infectious diseases* 4, 761-776.
- Palacios, J.J., Navarro, Y., Romero, B., A., P., González, Á.M., Hernández, M.D.P., Fernández-Verdugo, A., Copano, F., Torreblanca, A., Bouza, E., Domínguez, L., de Juan, L., García-de-Viedma, D., 2009. Molecular and epidemiological population-based integrative analysis of human and animal *Mycobacterium bovis* infections in a low-prevalence setting. *Veterinary Microbiology* 195, 30-36.
- Palenque, E., Villena, V., Rebollo, M.J., Jiménez, M.S., Samper, S., 1998. Transmission of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* to an immunocompetent patient. *Clinical Infectious Diseases* 26, 995-996.
- Palmer, J.D., Strong Jr, H.R., Upfal, E., 2004. Method and apparatus for accessing shared resources with asymmetric safety in a multiprocessing system. U.S. Patent 6,748,438.
- Palmer, M.V., 2007. Tuberculosis: a reemerging disease at the interface of domestic animals and wildlife. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 315, 195-215.
- Palmer, M.V., Thacker, T.C., Waters, W.R., 2007. Vaccination of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) with *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guerin. *Vaccine* 25, 6589-6597.
- 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, 243-251.
- Palmer, M.V., Thacker, T.C., Waters, W.R., Robbe-Austerman, S., Lebepe Mazur, S.M., Harris, N.B., 2010. Persistence of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette Guerin in white tailed deer (*Odocoileus virginianus*) after oral or parenteral vaccination. *Zoonoses and Public Health* 57, e206-e212.

- Palmer, M.V., Whipple, D.L., Payeur, J.B., Bolin, C.A., 2011. Use of the intradermal tuberculin test in a herd of captive elk (*Cervus elaphus nelsoni*) naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23, 363-366.
- Palmer, M.V., Thacker, T.C., Waters, W.R., Gortázar, C., Corner, L.A., 2012. *Mycobacterium bovis*: a model pathogen at the interface of livestock, wildlife, and humans. *Veterinary Medicine International* 2012, 236205.
- Palmer, M.V., Thacker, T.C., Waters, W.R., Robbe-Austerman, S., 2014. Oral vaccination of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) with *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin (BCG). *PLoS One* 9, e97031.
- Palmer, M.V., O'Brien, D.J., Griffin, J.F., Nugent, G., de Lisle, G.W., Ward, A., Delahay, R.J., 2015. Tuberculosis in Wild and Captive Deer. En: *Tuberculosis, Leprosy and Mycobacterial Diseases of Man and Animals: The Many Hosts of Mycobacteria*. CAB International Publishers, Wallingford, United Kingdom, pp. 334-364.
- Park, H.T., Yoo, H.S., 2016. Development of vaccines to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection. *Clinical and Experimental Vaccine Research* 5, 108-116.
- Parlane, N.A., Shu, D., Subharat, S., Wedlock, D.N., Rehm, B.H., de Lisle, G.W., Buddle, B.M., 2014. Revaccination of cattle with Bacille Calmette-Guerin two years after first vaccination when immunity has waned, boosted protection against challenge with *Mycobacterium bovis*. *PLoS One* 9, e106519.
- Parra, A., Fernández-Llario, P., Tato, A., Larrasa, J., García, A., Alonso, J.M., Hermoso de Mendoza, M., Hermoso de Mendoza, H., 2003. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections of pigs and wild boars using a molecular approach. *Veterinary Microbiology* 97, 123-133.
- 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, 293-300.
- 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, 140-146.
- 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, 315-324.
- Pedersen, K., Bauer, N.E., Rodgers, S., Bazan, L.R., Mesenbrink, B.T., Gidlewski, T., 2017. Antibodies to various zoonotic pathogens detected in feral swine (*Sus scrofa*) at abattoirs in Texas, USA. *Journal of Food Protection* 80, 1239-1242.
- Pejsak, Z.K., Truszczynski, M.J., 2006. Aujeszky's disease (pseudorabies). En: *Diseases of Swine*. Ninth Edn. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, pp. 419-433.
- Pereira-Suárez, A.L., Estrada-Chávez, Y., Zuniga-Estrada, A., López-Rincón, G., Hernández, D.U., Padilla-Ramírez, F.J., Estrada-Chávez, C., 2014. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR in fresh cheese from local markets in Hidalgo, Mexico. *Journal of Food Protection* 77, 849-852.
- Pérez, A.M., Ward, M.P., Charmandarian, A., Ritacco, V., 2002. Simulation model of within-herd transmission of bovine tuberculosis in Argentine dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine* 54, 361-372.

- Pérez de Val, B., Allepuz, A., 2019. Una mirada al pasado, presente y futuro del control de la tuberculosis bovina.
<https://www.portalveterinaria.com/rumiantes/articulos/14208/una-mirada-al-pasado-presente-y-futuro-del-control-de-la-tuberculosis-bovina.html>
- Pérez de Val, B., López-Soria, S., Nofrarías, M., Martín, M., Vordermeier, H.M., Villarreal-Ramos, B., Romera, N., Escobar, M., Solanes, D., Cardona, P.J., Domingo, M., 2011. Experimental model of tuberculosis in the domestic goat after endobronchial infection with *Mycobacterium caprae*. *Clinical Vaccine Immunology* 18, 1872–1881.
- Pérez de Val, B., Nofrarías, M., López-Soria, S., Garrido, J.M., Vordermeier, H.M., Villarreal-Ramos, B., Martín, M., Puentes, E., Juste, R.A., Domingo, M., 2012a. Effects of vaccination against paratuberculosis on tuberculosis in goats: diagnostic interferences and cross-protection. *BMC Veterinary Research* 8, 191.
- Pérez de Val, B., Villarreal-Ramos, B., Nofrarías, M., López-Soria, S., Romera, N., Singh, M., Abad, F.X., Xing, Z., Vordermeier, H.M., Domingo, M., 2012b. Goats primed with *Mycobacterium bovis* BCG and boosted with a recombinant adenovirus expressing Ag85A show enhanced protection against tuberculosis. *Clinical and Vaccine Immunology* 19, 1339-1347.
- Pérez de Val, B., Vidal, E., Villarreal-Ramos, B., Gilbert, S.C., Andaluz, A., Moll, X., Martín, M., Nofrarías, M., McShane, H., Vordermeier, H.M., Domingo, M., 2013. A multi-antigenic adenoviral-vectored vaccine improves BCG-induced protection of goats against pulmonary tuberculosis infection and prevents disease progression. *PLoS One* 8, e81317.
- Pérez de Val, B., Grau-Roma, L., Segalés, J., Domingo, M., Vidal, E., 2014. Mycobacteriosis outbreak caused by *Mycobacterium avium* subsp. *avium* detected through meat inspection in five porcine fattening farms. *The Veterinary Record* 174, 96.
- Pérez de Val, B., Vidal, E., López-Soria, S., Marco, A., Cervera, Z., Martín, M., Mercader, I., Singh, M., Raeber, A., Domingo, M., 2016. Assessment of safety and interferon gamma responses of *Mycobacterium bovis* BCG vaccine in goat kids and milking goats. *Vaccine* 34, 881-886.
- Pérez de Val, B., Napp, S., Velarde, R., Lavin, 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, 275-283.
- Pérez de Val, B., Sanz, A., Soler, M., Allepuz, A., Michelet, L., Boschirolì, M.L., Vidal, E., 2019. *Mycobacterium microti* infection in free-ranging wild boar, Spain, 2017-2019. *Emerging Infectious Diseases* 25, 2152-2154.
- Pérez-Lago, L., Navarro, Y., García-de-Viedma, D., 2014. Current knowledge and pending challenges in zoonosis caused by *Mycobacterium bovis*: A review. *Research in Veterinary Science* 97, S94-S100.
- Pesciaroli, M., Russo, M., Mazzone, P., Aronica, V., Fiasconaro, M., Boniotti, M.B., Corneli, S., Cagiola, M., Pacciarini, M., Di Marco, V., Pasquali, P., 2012. Evaluation of the interferon-gamma (IFN- γ) assay to diagnose *Mycobacterium bovis* infection in pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 148, 369-372.
- Pesciaroli, M., Álvarez, J., Boniotti, M.B., Cagiola, M., Di Marco, V., Marianelli, C., Pacciarini, M., Pasquali, P., 2014. Tuberculosis in domestic animal species. *Research in Veterinary Science* 97, s78-s85.
- Pfeiffer, D.U., 2013. Epidemiology caught in the causal web of bovine tuberculosis. *Transboundary and Emerging Diseases*, 60, 104-110.

- Phillips, G.E., Lavelle, M.J., Fischer, J.W., White, J.J., Wells, S.J., VerCauteren, K.C., 2012. A novel bipolar electric fence for excluding white-tailed deer from stored livestock feed. *Journal of Animal Science* 90, 4090-4097.
- Picasso-Risso, C., Gil, A., Nunez, A., Suanes, A., Macchi, V., Salaberry, J., Pérez, A., 2019a. Diagnostic interaction between bovine tuberculosis (bTB) and Johne's disease in bTB highly prevalent dairy farms of Uruguay. *Veterinary and Animal Science* 7, 100052.
- Picasso-Risso, C., Grau, A., Bakker, D., Nacar, J., Mínguez, O., Pérez, A., Álvarez, J., 2019b. Association between results of diagnostic tests for bovine tuberculosis and Johne's disease in cattle. *Veterinary Record* 185, 693.
- Pinya, S., Lassnig, N., 2018. First record of free-ranging fallow deer (*Dama dama*) in Mallorca (Balearic Islands, Spain). *Galemys*, 30, 63-65.
- Pollock, J.M., Neill, S.D., 2002. *Mycobacterium bovis* infection and tuberculosis in cattle. *The Veterinary Journal* 163, 115-127.
- Price-Carter, M., Brauning, R., de Lisle, G.W., Livingstone, P., Neill, M., Sinclair, J., Paterson, B., Atkinson, G., Knowles, G., Crews, K., Crispell, J., Kao, R., Robbe-Austerman, S., Stuber, T., Parkhill, J., Wood, J., Harris, S., Collins, D.M., 2018. Whole genome sequencing for determining the source of *Mycobacterium bovis* infections in livestock herds and wildlife in New Zealand. *Frontiers in Veterinary Science* 5, 272.
- Prieto, J.M., Balseiro, A., Casais, R., Abendaño, N., Fitzgerald, L.E., Garrido, J.M., Juste, R.A., Alonso-Hearn, M., 2014. Sensitive and specific enzyme-linked immunosorbent assay for detecting serum antibodies against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fallow deer. *Clinical and Vaccine Immunology* 21, 1077-1085.
- Prodinger, W.M., Brandstatter, A., Naumann, L., Pacciarini, M., Kubica, T., Boschiroli, M.L., Aranaz, A., Nagy, G., Cvetnic, Z., Ocepek, M., Skrypyk, A., Erler, W., Niemann, S., Pavlik, I., Moser, I., 2005. Characterization of *Mycobacterium caprae* isolates from Europe by mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 4984-4992.
- Pucken, V.B., Knubben-Schweizer, G., Döpfer, D., Groll, A., Hafner-Marx, A., Hörmansdorfer, S., Sauter-Louis, C., Straubinger, R.K., Zimmermann, P., Hartnack, S., 2017. Evaluating diagnostic tests for bovine tuberculosis in the southern part of Germany: A latent class analysis. *PLoS One* 12, e0179847.
- Quan, Z., Haiming, T., Xiaoyao, C., Weifeng, Y., Hong, J., Hongfei, Z., 2016. Development of one-tube multiplex polymerase chain reaction (PCR) for detecting *Mycobacterium bovis*. *The Journal of Veterinary Medical Science* 78, 1873-1876.
- Queirós, J., Álvarez, 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, 327-334.
- Quintas, H., Reis, J., Pires, I., Alegria, N., 2010. Tuberculosis in goats. *Veterinary Record* 166, 437.
- Quirós-Fernández, F., Marcos, J., Acevedo, P., Gortázar, C., 2017. Hunters serving the ecosystem: the contribution of recreational hunting to wild boar population control. *European Journal of Wildlife Research* 63, 57.
- Radomski, N., Kreitmann, L., McIntosh, F., Behr, M.A., 2013. The critical role of DNA extraction for detection of mycobacteria in tissues. *PLoS One* 8, e78749.
- Ramírez, A., 2019. ¿Cuáles son las enfermedades más letales de la historia?
<https://www.wikiversus.com/salud/enfermedades-mas-letales-historia/>

- Ramírez-Villaescusa, A.M., Medley, G.F., Mason, S., Green, L.E., 2010. Risk factors for herd breakdown with bovine tuberculosis in 148 cattle herds in the south west of England. *Preventive Veterinary Medicine* 95, 224-230.
- Real Academia Española (RAE), 2014. 23 edición. www.rae.es
- Real Decreto 2611/1996, de 20 de diciembre, por el que se regulan los programas nacionales de erradicación de enfermedades de los animales.
- Real Decreto 1716/2000, de 13 de octubre, sobre normas sanitarias para el intercambio intracomunitario de animales de las especies bovina y porcina.
- Real Decreto 1082/2009, de 3 de julio, por el que se establecen los requisitos de sanidad animal para el movimiento de animales de explotaciones cinegéticas, de acuicultura continental y de núcleos zoológicos, así como de animales de fauna silvestre.
- Real Decreto 186/2011, de 18 de febrero, por el que se regula la calificación sanitaria de las ganaderías Reglamento (UE) 2016/429 del Parlamento Europeo y del Consejo de 9 de marzo de 2016, relativo a las enfermedades transmisibles de los animales y por el que se modifican o derogan algunos actos en materia de sanidad animal.
- Real Decreto 389/2011, de 18 de marzo, por el que se establecen los baremos de indemnización de animales en el marco de los programas nacionales de lucha, control o erradicación de la tuberculosis bovina, brucelosis bovina, brucelosis ovina y caprina, lengua azul y encefalopatías espongiiformes transmisibles.
- Real Decreto 50/2018, de 2 de febrero, por el que se desarrollan las normas de control de subproductos animales no destinados al consumo humano y de sanidad animal, en la práctica cinegética de caza mayor.
- Real Decreto 138/2020, de 28 de enero, por el que se establece la normativa básica en materia de actuaciones sanitarias en especies cinegéticas que actúan como reservorio de la tuberculosis (complejo *Mycobacterium tuberculosis*).
- Rees, C., Botsaris, G., 2012. The Use of Phage for Detection, Antibiotic Sensitivity Testing and Enumeration. En: *Understanding Tuberculosis - Global Experiences and Innovative Approaches to the Diagnosis*. IntechOpen, Rijeka, Croatia, pp. 293-306.
- Reglamento (UE) N° 652/2014 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 15 de mayo de 2014 por el que se establecen disposiciones para la gestión de los gastos relativos a la cadena alimentaria, la salud animal y el bienestar de los animales, y relativos a la fitosanidad y a los materiales de reproducción vegetal, y por el que se modifican las Directivas 98/56/CE, 2000/29/CE y 2008/90/CE del Consejo, los Reglamentos (CE) n o 178/2002, (CE) n o 882/2004, (CE) n o 396/2005 y (CE) n o 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo y la Directiva 2009/128/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, y por el que se derogan las Decisiones 66/399/CEE, 76/894/CEE y 2009/470/CE del Consejo.
- Reglamento de Ejecución (UE) 2018/1882 de la Comisión de 3 de diciembre de 2018, relativo a la aplicación de determinadas normas de prevención y control a categorías de enfermedades enumeradas en la lista y por el que se establece una lista de especies y grupos de especies que suponen un riesgo considerable para la propagación de dichas enfermedades de la lista.
- Reviriego-Gordejo, F.J., Vermeersch, J.P., 2006. Towards eradication of bovine tuberculosis in the European Union. *Veterinary Microbiology* 112, 101-109.
- Rhodes, S.G., Terry, L.A., Hope, J., Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M., 2003. 1,25-dihydroxyvitamin D3 and development of tuberculosis in cattle. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 10, 1129-1135.

- Rhodes, S., Holder, T., Clifford, D., Dexter, I., Brewer, J., Smith, N., Waring, L., Crawshaw, T., Gillgan, S., Lyashchenko, K., Lawrence, J., Clarke, J., de la Rúa-Domenech, R., Vordermeier, M., 2012. Evaluation of gamma interferon and antibody tuberculosis tests in alpacas. *Clinical and Vaccine Immunology* 19, 1677-1683.
- Richards, W.D., 1990. In vitro and in vivo inhibition of *Mycobacterium paratuberculosis* by iron deprivation. A hypothesis. En: *Johnes Disease. Current Trends in Research, Diagnosis and Management*. CSIRO publications, Australia, pp. 87-94.
- Rieguel, R., 2019. Cruel farmer jailed for bovine TB fraud. <https://www.independent.ie/irish-news/cruel-farmer-jailed-for-bovine-tb-fraud-26086855.html>
- Riordan, P., Delahay, R.J., Cheeseman, C., Johnson, P.J., Macdonald, D.W., 2011. Culling-induced changes in badger (*Meles meles*) behavior, social organization and the epidemiology of bovine tuberculosis. *PLoS One* 6, e28904.
- Risalde, M.Á., Thomas, J., Sevilla, I., Serrano, M., Ortíz, J.A., Garrido, J., Domínguez, M., Domínguez, L., Gortázar, C., Ruiz-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, 341.
- Risalde, M.A., Roy, Á., Bezos, J., Pineda, C., Casal, C., Diéz-Guerrier, A., López-Villalba, I., Fernández-Manzano, Á., Moreno, I., de Juan, L., Domínguez, L., Gortázar, C., 2019. Hypervitaminosis D has no positive effects on goat tuberculosis and may cause chronic renal lesions. *Veterinary Record* 185, 759.
- Risco, D., Fernández-Llario, P., García-Jiménez, W.L., Gonçalves, P., Cuesta, J.M., Martínez, R., Sanz, C., Gómez, L., Carranza, J., Hermoso de Mendoza, J., 2013. Influence of porcine circovirus type 2 infections on bovine tuberculosis in wild boar populations. *Transboundary and Emerging Diseases* 60, 121-127.
- 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, e110123.
- 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.
- 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* 15, 388-395.
- Risco, D., Gonçalves, P., Bravo, M., García-Jiménez, W., Cerrato, R., Hermoso de Mendoza, J., Fernández-Llario, P., 2019a. Seasonal and dietary effects on Vitamin D deficiencies detected in wild boar from mid-western Spain. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 103, 668-674.
- Risco, D., Martínez, R., Bravo, M., Fernández Llario, P., Cerrato, R., García-Jiménez, W.L., Gonçalves, P., García, A., Barquero-Pérez, Ó., Quesada, A., Hermoso de Mendoza, J., 2019b. Nasal shedding of *Mycobacterium tuberculosis* in wild boar is related to generalised tuberculosis and concomitant infections. *Veterinary Record* 185, 629.
- Rivero, A., Márquez, M., Santos, J., Pinedo, A., Sánchez, M.A., Esteve, A., Samper, S., Martín, C., 2001. High rate of tuberculosis reinfection during a nosocomial outbreak

- of multidrug-resistant tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* strain B. *Clinical Infectious Diseases* 32, 159-161.
- 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, e51396.
- Robbe-Austerman, S., Bravo, D.M., Harris, B., 2013. Comparison of the MGIT 960, BACTEC 460 TB and solid media for isolation of *Mycobacterium bovis* in United States veterinary specimens. *BMC Veterinary Research* 9, 74.
- Robinson, P.A., 2019. Farmer and veterinarian attitudes towards the risk of zoonotic *Mycobacterium bovis* infection in Northern Ireland. *Veterinary Record* 185.
- Robinson, P.A., Corner, L.A., Courcier, E.A., McNair, J., Artois, M., Menzies, F.D., Abernethy, D.A., 2012. BCG vaccination against tuberculosis in European badgers (*Meles meles*): a review. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 35, 277-287.
- Rodríguez, J.G., Fissanoti, J.C., Del Portillo, P., Patarroyo, M.E., Romano, M.I., Cataldi, A., 1999. Amplification of a 500-base-pair fragment from cultured isolates of *Mycobacterium bovis*. *Journal of Clinical Microbiology* 37, 2330-2332.
- Rodríguez, E., Sánchez, L.P., Pérez, S., Herrera, L., Jiménez, M.S., Samper, S., Iglesias, M.J., 2009. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* in Spain, 2004-2007. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 13, 1536-1541.
- Rodríguez, S., Romero, B., Bezos, J., de Juan, L., Álvarez, J., Castellanos, E., Moya, N., Lozano, F., González, S., Sáez-Llorente, J.L., Mateos, A., Domínguez, L., Aranaz, A., Spanish Network on, S., Monitoring of Animal, T., 2010. High spoligotype diversity within a *Mycobacterium bovis* population: clues to understanding the demography of the pathogen in Europe. *Veterinary Microbiology* 141, 89-95.
- Rodríguez, S., Bezos, J., Romero, B., de Juan, L., Álvarez, J., Castellanos, E., Moya, N., Lozano, F., Javed, M.T., Sáez-Llorente, J.L., Liebana, E., Mateos, A., Domínguez, L., Aranaz, A., Monit, S.N.S., 2011. *Mycobacterium caprae* infection in livestock and wild-life, Spain. *Emerging Infectious Diseases* 17, 532-535.
- 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., 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: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 12, 877-882.
- Rodríguez-Campos, S., Navarro, Y., Romero, B., de Juan, L., Bezos, J., Mateos, A., Golby, P., Smith, N.H., Hewinson, G.R., Domínguez, L., García-de-Viedma, D., Aranaz, A., 2013. Splitting of a prevalent *Mycobacterium bovis* spoligotype by variable-number tandem-repeat typing reveals high heterogeneity in an evolving clonal group. *Journal of Clinical Microbiology* 51, 3658-3665.
- Rodríguez-Prieto, V., Martínez-López, B., Barasona, J. Á., Acevedo, P., Romero, B., Rodríguez-Campos, S., Gortázar, C., Sánchez-Vizcaíno, 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.
- Rodwell, T.C., Moore, M., Moser, K.S., Brodine, S.K., Strathdee, S.A., 2008. Tuberculosis from *Mycobacterium bovis* in binational communities, United States. *Emerging Infectious Diseases* 14, 909-916.

- Romero, B., Aranaz, A., de Juan, L., Álvarez, J., Bezos, J., Mateos, A., Gómez-Mampaso, E., Domínguez, L., 2006. Molecular epidemiology of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* isolates with the same spoligotyping profile as isolates from animals. *Journal of Clinical Microbiology* 44, 3405-3408.
- Romero, B., Aranaz, A., Sandoval, A., Álvarez, J., de Juan, L., Bezos, J., Sánchez, C., Galka, M., Fernández, P., Mateos, A., Domínguez, L., 2008. Persistence and molecular evolution of *Mycobacterium bovis* population from cattle and wildlife in Doñana National Park revealed by genotype variation. *Veterinary Microbiology* 132, 87-95.
- Roring, S., Hughes, M.S., Skuce, R.A., Neill, S.D., 2000. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium bovis* directly from bovine tissue specimens by spoligotyping. *Veterinary Microbiology* 74, 227-236.
- Rossi, G., De Leo, G.A., Pongolini, S., Natalini, S., Vincenzi, S., Bolzoni, L., 2015. Epidemiological modelling for the assessment of bovine tuberculosis surveillance in the dairy farm network in Emilia-Romagna (Italy). *Epidemics* 11, 62-70.
- Rothel, J.S., Jones, S.L., Corner, L.A., Cox, J.C., Wood, P.R., 1990. A sandwich enzyme immunoassay for bovine interferon-gamma and its use for the detection of tuberculosis in cattle. *Australian Veterinary Journal* 67, 134-137.
- Rothel, J.S., Jones, S.L., Corner, L.A., Cox, J.C., Wood, P.R., 1992. The gamma-interferon assay for diagnosis of bovine tuberculosis in cattle: conditions affecting the production of gamma-interferon in whole blood culture. *Australian Veterinary Journal* 69, 1-4.
- Rothschild, B.M., Martin, L.D., Lev, G., Bercovier, H., Bar-Gal, G.K., Greenblatt, C., Donoghue, H., Spigelman, M., Brittain, D., 2001. *Mycobacterium tuberculosis* Complex DNA from an Extinct Bison Dated 17,000 Years before the Present. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 33, 305-311.
- Roy, A., de Juan, L., Romero, B., Díez-Guerrier, A., Domínguez, L., Bezos, J., 2017. Tuberculosis bovina: aspectos a considerar sobre la técnica de intradermotuberculización y el cultivo microbiológico. *Revista Asociación Frisona de Cantabria*.
- Roy, A., Infantes-Lorenzo, J.A., Blazquez, J.C., Venteo, A., 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.
- Roy, A., Risalde, 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.
- Roy, A., Díez-Guerrier, A., Ortega, J., de la Cruz, M.L., Sáez, J.L., Domínguez, L., de Juan, L., Álvarez, J., Bezos, J., 2019a. 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.
- Roy, A., Tomé, I., Romero, B., Lorente-Leal, V., Infantes-Lorenzo, J.A., Domínguez, M., Martín, C., Aguiló, N., Puentes, E., Rodríguez, E., de Juan, L., Risalde, M.A., Gortázar, C., Domínguez, L., Bezos, J., 2019b. Evaluation of the immunogenicity and efficacy of BCG and MTBVAC vaccines using a natural transmission model of tuberculosis. *Veterinary Research* 50, 82.
- Roy, A., Infantes-Lorenzo, J.A., Domínguez, M., Moreno, I., Pérez, M., García, N., García-Seco, T., Álvarez, J., Romero, B., Gortázar, C., de Juan, L., Domínguez, L., Bezos, J.,

2020. Evaluation of a new enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of tuberculosis in goat milk. *Research in Veterinary Science* 128, 217-223.
- Sáez-Llorente, J.L., Blázquez, J.C., Díez-Guerrier, A., 2017. Tuberculosis bovina. *Revista Asociación Frisona de Cantabria*.
- Salvador, L.C.M., O'Brien, D.J., Cosgrove, M.K., Stuber, T.P., Schooley, A.M., Crispell, J., Church, S.V., Grohn, Y.T., Robbe-Austerman, S., Kao, R.R., 2019. Disease management at the wildlife-livestock interface: Using whole-genome sequencing to study the role of elk in *Mycobacterium bovis* transmission in Michigan, USA. *Molecular Ecology* 28, 2192-2205.
- Samper, S., Martín, C., Pinedo, A., Rivero, A., Blázquez, J., Baquero, F., van Soolingen, D., van Embden, J., 1997. Transmission between HIV-infected patients of multidrug-resistant tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*. *AIDS* 11, 1237-1242.
- Samper, S., Iglesias, M.J., Rabanaque, M.J., Gómez, L.I., Lafoz, M.C., Jiménez, M.S., Ortega, A., Lezcano, M.A., van Soolingen, D., Martín, C., 2005. Systematic molecular characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from Spain. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 1220-1227.
- Sánchez, J., Tomás, L., Ortega, N., Buendía, A.J., del Río, L., Salinas, J., Bezos, J., Caro, M.R., Navarro, J.A., 2011. Microscopical and immunological features of tuberculoid granulomata and cavitary pulmonary tuberculosis in naturally infected goats. *Journal of Comparative Pathology* 145, 107-117.
- Santos, N., Almeida, V., Gortázar, 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, 129.
- 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, e0142079.
- Satish, R., Desouza, A., 2019. Study of characteristics of mycobacteriophage - A novel tool to treat *Mycobacterium* spp. *International Journal of Mycobacteriology* 8, 170-174.
- Savelkoul, P.H.M., Catsburg, A., Mulder, S., Oostendorp, L., Schirm, J., Wilke, H., van der Zanden, A.G.M., Noordhoek, G.T., 2006. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex with Real Time PCR: Comparison of different primer-probe sets based on the IS6110 element. *Journal of Microbiological Methods* 66, 177-180.
- Schiller, I., Waters, W.R., Vordermeier, H.M., Nonnecke, B., Welsh, M., Keck, N., Whelan, A., Sigafoose, T., Stamm, C., Palmer, M., Thacker, T., Hardegger, R., Marg-Haufe, B., Raeber, A., Oesch, B., 2009. Optimization of a whole-blood gamma interferon assay for detection of *Mycobacterium bovis*-infected cattle. *Clinical and Vaccine Immunology* 16, 1196-1202.
- Schiller, I., Oesch, B., Vordermeier, H.M., Palmer, M.V., Harris, B.N., Orloski, K.A., Buddle, B.M., Thacker, T.C., Lyashchenko, K.P., Waters, W.R., 2010. Bovine tuberculosis: a review of current and emerging diagnostic techniques in view of their relevance for disease control and eradication. *Transboundary and Emerging Diseases* 57, 205-220.
- Schiller, I., RayWaters, W., Vordermeier, H.M., Jemmi, T., Welsh, M., Keck, N., Whelan, A., Gormley, E., Boschirolti, M.L., Moyon, J.L., Vela, C., Cagiola, M., Buddle, B.M., Palmer, M., Thacker, T., Oesch, B., Oesch, B., 2011. Bovine tuberculosis in Europe from the perspective of an officially tuberculosis free country: Trade, surveillance and diagnostics. *Veterinary Microbiology* 151, 153-159.
- Segalés, J., Allan, G.M., Domingo, M., 2006. Porcine circovirus diseases. En: *Diseases of Swine*. Blackwell Publishing, Ames, Iowa, pp. 299-307.

- Sei, S., Kleiner, D.E., Kopp, J.B., Chandra, R., Klotman, P.E., Yarchoan, R., Pizzo, P.A., Mitsuya, H., 1994. Quantitative analysis of viral burden in tissues from adults and children with symptomatic human immunodeficiency virus type 1 infection assessed by polymerase chain reaction. *The Journal of Infectious Diseases* 170, 325-333.
- Seibert, F.B., 1941. The Chemistry of the proteins of the acid-fast bacilli. *Bacteriological reviews* 5, 69-95.
- Sergeant, E.S.G., Happold, J., Langstaff, I., 2017. Evaluation of Australian surveillance for freedom from bovine tuberculosis. *Australian Veterinary Journal* 95, 474-479.
- 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., 2017. Tuberculosis detection in paratuberculosis vaccinated calves: New alternatives against interference. *PLoS One* 12, e0169735.
- Serrano, M., Sevilla, I.A., Fuertes, M., Geijo, M., Risalde, M.A., Ruiz-Fons, J.F., Gortázar, 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, 74.
- Sester, M., van Leth, F., Bruchfeld, J., Bumbacea, D., Cirillo, D.M., Dilektasli, A.G., Domínguez, J., Duarte, R., Ernst, M., Eyuboglu, F.O., Gerogianni, I., Girardi, E., Goletti, D., Janssens, J.P., Julander, I., Lange, B., Latorre, I., Losi, M., Markova, R., Matteelli, A., Milburn, H., Ravn, P., Scholman, T., Soccac, P.M., Straub, M., Wagner, D., Wolf, T., Yalcin, A., Lange, C., 2014. Risk assessment of tuberculosis in immunocompromised patients. A TBNET Study. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 190, 1168-1176.
- Seva, J., Sanes, J.M., Ramis, G., Mas, A., Quereda, J.J., Villarreal-Ramos, B., Villar, D., Pallares, F.J., 2014. Evaluation of the single cervical skin test and interferon gamma responses to detect *Mycobacterium bovis* infected cattle in a herd co-infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary Microbiology*, 171, 139-146.
- 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* 53, 930-940.
- 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, e1030.
- Seward, R., 2007. Method of enabling a wireless information device to access customer support services. U.S. Patent Application 10,575,069.
- Shanahan, A., Good, M., Duignan, A., Curtin, T., More, S.J., 2011. Tuberculosis in goats on a farm in Ireland: epidemiological investigation and control. *Veterinary Record* 168, 485.
- Shury, T.K., Bergeson, D., Surujballi, O., Lyashchenko, K.P., Greenwald, R., 2014. Field evaluation of three blood-based assays for elk (*Cervus canadensis*) naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *Preventive Veterinary Medicine* 115, 109-121.
- Sibhat, B., Asmare, K., Demissie, K., Ayelet, G., Mamo, G., Ameni, G., 2017. Bovine tuberculosis in Ethiopia: A systematic review and meta-analysis. *Preventive Veterinary Medicine* 147, 149-157.
- Sidders, B., Pirson, C., Hogarth, P.J., Hewinson, R.G., Stoker, N.G., Vordermeier, H.M., Ewer, K., 2008. Screening of highly expressed mycobacterial genes identifies Rv3615c as a useful differential diagnostic antigen for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Infection and Immunity* 76, 3932-3939.

- Silva, L.B., Veigas, B., Doria, G., Costa, P., Inácio, J., Martins, R., Fortunato, E., Baptista, P.V., 2011. Portable optoelectronic biosensing platform for identification of mycobacteria from the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Biosensors and Bioelectronics* 26, 2012-2017.
- Simon-Grifé, M., Martín-Valls, G.E., Vilar-Ares, M.J., García-Bocanegra, I., Martín, M., Mateu, E., Casal, J., 2013. Biosecurity practices in Spanish pig herds: perceptions of farmers and veterinarians of the most important biosecurity measures. *Preventive Veterinary Medicine* 110, 223-231.
- SITRAN, 2019. Sistema Integral de Trazabilidad Animal.
<https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/trazabilidad-animal/registro/default.aspx>
- Skuce, R., McCorry, T.P., McCarroll, J.F., Roring, S.M.M., Scott, A.N., Brittain, D., Hughes, S.L., Hewinson, G.R., Neill, S.D., 2002. Discrimination of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria using novel VNTR-PCR targets. *Microbiology* 148, 519-528.
- Skuce, R.A., Allen, A.R., McDowell, S.W., 2012. Herd-level risk factors for bovine tuberculosis: a literature review. *Veterinary Medicine International* 2012, 621210.
- Smith, N.H., Upton, P., 2012. Naming spoligotype patterns for the RD9-deleted lineage of the *Mycobacterium tuberculosis* complex; www.Mbovis.org. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases* 12, 873-876.
- Smith, R.L., Schukken, Y.H., Lu, Z., Mitchell, R.M., Grohn, Y.T., 2013. Development of a model to simulate infection dynamics of *Mycobacterium bovis* in cattle herds in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 243, 411-423.
- Sobrinho, R., Martín-Hernando, M.P., Vicente, J., Aurtenetxe, O., Garrido, J.M., Gortázar, C., 2008. Bovine tuberculosis in a badger (*Meles meles*) in Spain. *Veterinary Record* 163, 159-160.
- Song, N., Tan, Y., Zhang, L., Luo, W., Guan, Q., Yan, M.Z., Zuo, R., Liu, W., Luo, F.L., Zhang, X.L., 2018. Detection of circulating *Mycobacterium tuberculosis*-specific DNA by droplet digital PCR for vaccine evaluation in challenged monkeys and TB diagnosis article. *Emerging Microbes & Infections*. 7, 78.
- Soo, P.C., Horng, Y.T., Hsueh, P.R., Shen, B.J., Wang, J.Y., Tu, H.H., Wei, J.R., Hsieh, S.C., Huang, C.C., Lai, H.C., 2006. Direct and Simultaneous Identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) and *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) by Rapid Multiplex nested PCR-ICT assay. *Journal of Microbiological Methods* 66, 440-448.
- Sorensen, A., van Beest, F.M., Brook, R.K., 2014. Impacts of wildlife baiting and supplemental feeding on infectious disease transmission risk: a synthesis of knowledge. *Preventive Veterinary Medicine* 113, 356-363.
- Souza, Il., Melo, E.S., Ramos, C.A., Farias, T.A., Osorio, A.L., Jorge, K.S., Vidal, C.E., Silva, A.S., Silva, M.R., Pellegrin, A.O., Araujo, F.R., 2012. Screening of recombinant proteins as antigens in indirect ELISA for diagnosis of bovine tuberculosis. *Springerplus* 1, 77.
- Srinivasan, S., Jones, G., Veerasami, M., Steinbach, S., Holder, T., Zewude, A., Fromsa, A., Ameni, G., Easterling, L., Bakker, D., Juleff, N., Gifford, G., Hewinson, R.G., Vordermeier, H.M., Kapur, V., 2019. A defined antigen skin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Science Advances* 5, eaax4899.
- Stevenson, K., Hughes, V.M., de Juan, L., Inglis, N.F., Wright, F., Sharp, J.M., 2002. Molecular characterization of pigmented and nonpigmented isolates of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Journal of clinical microbiology* 40, 1798-1804.

- Stewart, L.D., McNair, J., McCallan, L., Gordon, A., Grant, I.R., 2013. Improved detection of *Mycobacterium bovis* infection in bovine lymph node tissue using immunomagnetic separation (IMS)-based methods. *PLoS One* 8, e58374.
- Stringer, L.A., Wilson, P.R., Heuer, C., Hunnam, J.C., Mackintosh, C.G., 2011. Effect of vaccination and natural infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* on specificity of diagnostic tests for bovine tuberculosis in farmed red deer (*Cervus elaphus*). *New Zealand Veterinary Journal* 59, 218-224.
- Stylianou, E., Harrington-Kandt, R., Beglov, J., Bull, N., Pinpathomrat, N., Swarbrick, G.M., Lewinsohn, D.A., Lewinsohn, D.M., McShane, H., 2018. Identification and evaluation of novel protective antigens for the development of a candidate tuberculosis subunit vaccine. *Infection and immunity* 86, e00014- e00018.
- Sunder, S., Lanotte, P., Godreuil, S., Martin, C., Boschirolì, M.L., Besnier, J.M., 2009. Human-to-human transmission of tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in immunocompetent patients. *Journal of Clinical Microbiology* 47, 1249-1251.
- Supply, P., 2005. Protocol and guidelines for Multilocus Variable Number Tandem Repeat Genotyping of *Mycobacterium bovis* (Annex), Technical Guide 6, 1-74.
- Supply, P., Magdalena, J., Himpens, S., Loch, C., 1997. Identification of novel intergenic repetitive units in a mycobacterial two-component system operon. *Molecular Microbiology* 26, 991-1003.
- Supply, P., Allix, C., Lesjean, S., Cardoso-Oelemann, M., Rusch-Gerdes, S., Willery, E., Savine, E., de Haas, P., van Deutekom, H., Roring, S., Bifani, P., Kurepina, N., Kreiswirth, B., Sola, C., Rastogi, N., Vatin, V., Gutierrez, M.C., Fauville, M., Niemann, S., Skuce, R., Kremer, K., Loch, C., van Soolingen, D., 2006. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* 44, 4498-4510.
- Surujballi, O., Lutze-Wallace, C., Turcotte, C., Savic, M., Stevenson, D., Romanowska, A., Monagle, W., Berlie-Surujballi, G., Tangorra, E., 2009. Sensitive diagnosis of bovine tuberculosis in a farmed cervid herd with use of an MPB70 protein fluorescence polarization assay. *Canadian Journal of Veterinary Research* 73, 161-166.
- Swift, B.M.C., Gerrard, Z.E., Huxley, J.N., Rees, C.E.D., 2014. Factors affecting phage D29 infection: A tool to investigate different growth states of mycobacteria. *PLoS One* 9, e106690.
- Swift, B.M.C., Convery, T.W., Rees, C.E.D., 2016. Evidence of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteraemia in intradermal skin test positive cattle detected using phage-RPA. *Virulence* 7, 779-788.
- Tameni, S., Amadori, M., Scaccaglia, P., Quondam-Giandomenico, R., Tagliabue, S., Achetti, I.L., Adone, R., Ciuchini, F., 1998. Quality controls and in vitro diagnostic efficiency of bovine PPD tuberculins. *Biologicals* 26, 225-235.
- Tanner, E., White, A., Acevedo, P., Balseiro, A., Marcos, J., Gortázar, C., 2019. Wolves contribute to disease control in a multi-host system. *Scientific Reports* 9, 7940.
- Tato, Á., 1999. Infecciones por *Mycobacterium* spp. en animales silvestres de la provincia de Cáceres. Thesis, doctorate. University Extremadura, Spain.
- Taylor, G., Worth, D., Palmer, S., Jahans, K., Hewinson, R., 2007. Rapid detection of *Mycobacterium bovis* DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR. *BMC Veterinary Research* 3, 12.

- Taylor, M., Hughes, M., Skuce, R., Neill, S., 2001. Detection of *Mycobacterium bovis* in bovine clinical specimens using real-time fluorescence and fluorescence resonance energy transfer probe rapid-cycle PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 39, 1272-1278.
- Tchilian, E.Z., Desel, C., Forbes, E.K., Bandermann, S., Sander, C.R., Hill, A.V., McShane, H., Kaufmann, S.H., 2009. Immunogenicity and protective efficacy of prime-boost regimens with recombinant (delta)ureC hly+ *Mycobacterium bovis* BCG and modified vaccinia virus ankara expressing M. tuberculosis antigen 85A against murine tuberculosis. *Infection and Immunity* 77, 622-631.
- Thacker, T.C., Harris, B., Palmer, M.V, Waters, W.R., 2011. Improved specificity for detection of *Mycobacterium bovis* in fresh tissues using IS6110 real-time PCR. *BMC Veterinary Research* 7, 50.
- Thakur, M.K., Sinha, D.K., Singh, B.R., 2016. Evaluation of complementary diagnostic tools for bovine tuberculosis detection in dairy herds from India. *Veterinary World* 9, 862-868.
- Thierry, D., Brisson-Noël, A., Vicent-Lévy-Frédault, V., Nguyen, S., Guesdon, J.L., Gicquel, B., 1990. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis. *Journal of Clinical Microbiology* 28, 2668-2673.
- Thirgood, S., 2009. New perspectives on managing wildlife diseases. *Journal of Applied Ecology* 46, 454-456.
- Thomas, J., Rivalde, M.Á., Serrano, M., Sevilla, I., Geijo, M., Ortíz, J. A., Fuertes, M., Ruiz-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.
- Thomas, J., Infantes-Lorenzo, J.A., Moreno, I., Cano-Terriza, D., de Juan, L., García-Bocanegra, I., Domínguez, L., Domínguez, M., Gortázar, C., Rivalde, 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.
- Thomas, J., Infantes-Lorenzo, J.A., Moreno, I., Romero, B., Garrido, J.M., Juste, R., Domínguez, M., Domínguez, L., Gortázar, C., Rivalde, M.A., 2019b. A new test to detect antibodies against *Mycobacterium tuberculosis* complex in red deer serum. *The Veterinary Journal* 244, 98-103.
- Thorel, M.F., Huchzermeyer, H., Weiss, R., Fontaine, J.J., 1997. *Mycobacterium avium* infections in animals. Literature review. *Veterinary Research* 28, 439-447.
- Thorel, M.F., Huchzermeyer, H.F., Michel, A.L., 2001. *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* infection in mammals. *Revue Scientifique et Technique* 20, 204-218.
- Thrusfield, M., 2007. *Veterinary epidemiology*. Third Edn. Blackwell Science Ltd., Oxford.
- Timmermann, C.A.G., Biering-Sørensen, S., Aaby, P., Fisker, A.B., Monteiro, I., Rodrigues, A., Benn, C.S., Ravn, H., 2015. Tuberculin reaction and BCG scar: association with infant mortality. *Tropical Medicine International Health* 20, 1733-1744.
- Tompkins, D.M., Ramsey, D.S.L., Cross, M.L., Aldwell, F.E., de Lisle, G.W., Buddle, B.M., 2009. Oral vaccination reduces the incidence of bovine tuberculosis in a free-living wildlife species. *Proceedings of the Royal Society B. Biological Sciences* 276, 2987-2995.

- Torgerson, P.R., Torgerson, D.J., 2010. Public health and bovine tuberculosis: what's all the fuss about?. *Trends in Microbiology* 18, 67-72.
- 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, 415-422.
- 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, e0211216.
- Tschopp, R., Bobosha, K., Aseffa, A., Schelling, E., Habtamu, M., Iwnetu, R., Hailu, E., Firdessa, R., Hussein, J., Young, D., Zinsstag, J., 2011. Bovine tuberculosis at a cattle-small ruminant-human interface in Meskan, Gurage region, central Ethiopia. *BMC Infectious Diseases* 11, 318.
- Turenne, C.Y., Wallace, R., Behr, M.A., 2007. *Mycobacterium avium* in the postgenomic era. *Clinical Microbiology Reviews* 20, 205-229.
- Tzeng, S.Y., McHugh, K.J., Behrens, A.M., Rose, S., Sugarman, J.L., Ferber, S., Langer, R., Jaklenec, A., 2018. Stabilized single-injection inactivated polio vaccine elicits a strong neutralizing immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115, E5269-E5278.
- Umeshappa, C.S., Singh, K.P., Nanjundappa, R.H., Pandey, A.B., 2010. Apoptosis and immuno-suppression in sheep infected with bluetongue virus serotype-23. *Veterinary Microbiology* 144, 310-318.
- 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, 154.
- Van der Burgt, G.M., Drummond, F., Crawshaw, T., Morris, S., 2013. An outbreak of tuberculosis in Lleyn sheep in the United Kingdom associated with clinical signs. *Veterinary Record* 172, 69.
- 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, 4140.
- Van der Zanden, A.G., Kremer, K., Schouls, L.M., Caimi, K., Cataldi, A., Hulleman, A., Nagelkerke, N.J., van Soolingen, D., 2002. Improvement of differentiation and interpretability of spoligotyping for *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by introduction of new spacer oligonucleotides. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 4628-4639.
- Van Embden, J.D.A., van Gorkom, T., Kremer, K., Jansen, R., van der Zeijst, B.A.M., Schouls, L.M., 2000. Genetic variation and evolutionary origin of the direct repeat locus of *Mycobacterium tuberculosis* Complex bacteria. *Journal of Bacteriology* 182, 2393-2401.
- Van Ingen, J., Rahim, Z., Mulder, A., Boeree, M.J., Simeone, R., Brosch, R., van Soolingen, D., 2012. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. *Emerging Infectious Diseases* 18, 653-655.
- Varello, K., Pezzoloto, M., Mascarino, D., Ingravalle, F., Caramelli, M., Bozzetta, E., 2008. Comparison of histologic techniques for the diagnosis of bovine tuberculosis in the framework of eradication programs. *The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 20, 164-169.

- Vargas, R., Marassi, C.D., Oelemann, W., Lilienbaum, W., 2009. Interference of intradermal tuberculin tests on the serodiagnosis of paratuberculosis in cattle. *Research in Veterinary Science*, 86, 371-372.
- Vayr, F., Martin-Blondel, G., Savall, F., Soulat, J.M., Deffontaines, G., Herin, F., 2018. Occupational exposure to human *Mycobacterium bovis* infection: A systematic review. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12.
- Venteo, A., Rebollo, B., Sarraseca, J., Rodríguez, M.J., Sanz, A., 2012. A novel double recognition enzyme-linked immunosorbent assay based on the nucleocapsid protein for early detection of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Journal of Virological Methods* 181, 109-113.
- VerCauteren, K.C., Gilsdorf, J.M., Hygnstrom, S.E., Fioranelli, P.B., Wilson, J.A., Barras, S., 2006a. Green and blue lasers are ineffective for dispersing deer at night. *Wildlife Society Bulletin* 34, 371-374.
- VerCauteren, K.C., Lavelle, M.J., Hygnstrom, S., 2006b. From the Field: Fences and Deer-damage management: a review of designs and efficacy. *Wildlife Society Bulletin* 34, 191-200.
- VerCauteren, K.C., Seward, N.W., Lavelle, M.J., Fischer, J.W., Phillips, G.E., 2007. A fence design for excluding elk without impeding other wildlife. *Rangeland ecology & management* 60, 529-532.
- VerCauteren, K.C., Lavelle, M.J., Phillips, G.E., 2008. Livestock protection dogs for deterring deer from cattle and feed. *The Journal of Wildlife Management* 72, 1443-1448.
- VerCauteren, K.C., Vandeelen, T.R., Lavelle, M.J., Hall, W.H., 2010. Assessment of abilities of white-tailed deer to jump fences. *The Journal of Wildlife Management* 74, 1378-1381.
- Vial, F., Donnelly, C.A., 2012. Localized reactive badger culling increases risk of bovine tuberculosis in nearby cattle herds. *Biology letters* 8, 50-53.
- Vicente, J., Vercautern, K., 2019. The Role of Scavenging in Disease Dynamics. En: *Carrion Ecology and Management*. Wildlife Research Monographs. Springer Nature Switzerland AG, Cham, Switzerland. pp. 161-182.
- Vicente, J., Delahay, R.J., Wlaker, N., Cheeseman, C.L., 2007a. Social organization and movement influence the incidence of bovine tuberculosis in an undisturbed high density badger *Meles meles* population. *The Journal of Animal Ecology* 76, 348-360.
- Vicente, J., Höfle, U., Garrido, J.M., Acevedo, P., Juste, R., Barral, M., Gortázar, C., 2007b. Risk factors associated with the prevalence of tuberculosis-like lesions in fenced wild boar and red deer in south central Spain. *Veterinary Research* 38, 451-464.
- Vicente, J., Carrasco, R., Acevedo, P., Montoro, V., Gortázar, C., 2011. Big Game Waste Production: Sanitary and Ecological Implications. En: *Integrated Waste Management 2*. IntechOpen, London, UK, pp. 97-128.
- Vicente, J., Barasona, J.A., Acevedo, P., Ruiz-Fons, J.F., Boadella, M., Díez-Delgado, I., Gortázar, C., 2013. Temporal trend of tuberculosis in wild ungulates from Mediterranean Spain. *Transboundary and Emerging Diseases* 60, 92-103.
- Vidal, D., Domingo, M., Aranaz, A., Liébana, E., Prats, N., Marco, A., Casal, J., Domínguez, L., Mateos, A., 1995. Eradication of tuberculosis from goat herds by means of the gamma-IFN assay and the single intradermal comparative skin test. En: Griffin F, de Lisle G (Eds.), *Tuberculosis in Wildlife and Domestic Animals*. University of Otago Press, Dunedin, New Zealand, pp. 328-330.

- Vidal, E., Tolosa, E., Espinar, S., de Val, B.P., Nofrarías, M., Alba, A., Allepuz, A., Grau-Roma, L., López-Soria, S., Martínez, J., Abarca, M.L., Castellà, J., Manteca, X., Casanova, M.I., Isidoro-Ayza, M., Galindo-Cardiel, I., Soto, S., Dolz, R., Majó, N., Ramis, A., Segalés, J., Mas, L., Chacón, C., Picart, L., Marco, A., Domingo, M., 2015. Six-Year Follow-up of Slaughterhouse Surveillance (2008-2013): The Catalan Slaughterhouse Support Network (SESC). *Veterinary Pathology* 53, 532-544.
- 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, 252.
- Vidal, E., Grasa, M., Perálvarez, T., Marín, M., Mercader, I., Pérez de Val, B., 2018. Transmission of tuberculosis caused by *Mycobacterium caprae* between dairy sheep and goats. *Small Ruminant Research* 158, 22-25.
- Vordermeier, H.M., Ewer, K., 2006. Specificity trial of the BOVIGAM® IFN-gamma test in GB cattle. *Journal of Vibration and Control* 16, 72-80.
- Vordermeier, H.M., Whelan, A., Cockle, P.J., Farrant, L., Palmer, N., Hewinson, R.G., 2001. Use of synthetic peptides derived from the antigens ESAT-6 and CFP-10 for differential diagnosis of bovine tuberculosis in cattle. *Clinical and Vaccine Immunology* 8, 571-578.
- Vordermeier, H.M., Brown, J., Cockle, P.J., Franken, W.P., Drijfhout, J.W., Arend, S.M., Ottenhoff, T.H., Jahans, K., Hewinson, R.G., 2007. Assessment of cross-reactivity between *Mycobacterium bovis* and *M. kansasii* ESAT-6 and CFP-10 at the T-cell epitope level. *Clinical and Vaccine Immunology* 14, 1203-1209.
- Vordermeier, H.M., Villarreal-Ramos, B., Cockle, P.J., McAulay, M., Rhodes, S.G., Thacker, T., Gilbert, S.C., McShane, H., Hill, A.V., Xing, Z., Hewinson, R.G., 2009. Viral booster vaccines improve *Mycobacterium bovis* BCG-induced protection against bovine tuberculosis. *Infection and Immunity* 77, 3364-3373.
- Vordermeier, H.M., Jones, G.J., Buddle, B.M., Hewinson, R.G., 2016a. Development of immune-diagnostic reagents to diagnose bovine tuberculosis in cattle. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 181, 10-14.
- Vordermeier, H.M., Jones, G.J., Buddle, B.M., Hewinson, R.G., Villarreal-Ramos, B., 2016b. Bovine tuberculosis in cattle: vaccines, diva tests, and host biomarker discovery. *Annual Review of Animal Biosciences* 4, 87-109.
- Vynnycky, E., White, R.G., 2010. An introduction to infectious disease modelling. *European Journal of Public Health* 22, 295.
- Wadhwa, A., Johnson, R.E., Mackintosh, C.G., Griffin, J.F., Waters, W.R., Bannantine, J.P., Eda, S., 2013. Use of ethanol extract of *Mycobacterium bovis* for detection of specific antibodies in sera of farmed red deer (*Cervus elaphus*) with bovine tuberculosis. *BMC Veterinary Research* 9, 256.
- Walter, W.D., Fischer, J.W., Anderson, C.W., Marks, D.R., Deliberto, T., Robbe-Austerman, S., Vercauteren, K.C., 2013. Surveillance and movements of Virginia opossum (*Didelphis virginiana*) in the bovine tuberculosis region of Michigan. *Epidemiology & Infection* 141, 1498-1508.
- Wards, B.J., Collins, D.M., de Lisle, G.W., 1995. Detection of *Mycobacterium bovis* in tissues by polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology* 43, 227-240.
- Waters, W.R., Palmer, M.V., Olsen, S.C., Sacco, R.E., Whipple, D.L., 2003. Immune responses of elk to *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guerin vaccination. *Vaccine* 21, 1518-1526.

- Waters, W.R., Nonnecke, B.J., Palmer, M.V., Robbe-Austermann, S., Bannantine, J.P., Stabel, J.R., Whipple, D.L., Payeur, J.B., Estes, D.M., Pitzer, J.E., Minion, F.C., 2004a. Use of recombinant ESAT-6:CFP-10 fusion protein for differentiation of infections of cattle by *Mycobacterium bovis* and by *M. avium* subsp. *avium* and *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 11, 729-735.
- Waters, W.R., Palmer, M.V., Bannantine, J.P., Whipple, D.L., Greenwald, R., Esfandiari, J., Andersen, P., McNair, J., Pollock, J.M., Lyashchenko, K.P., 2004b. Antigen recognition by serum antibodies in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 11, 849-855.
- Waters, W.R., Palmer, M.V., Thacker, T.C., Payeur, J.B., Harris, N.B., Minion, F.C., Greenwald, R., Esfandiari, J., Andersen, P., McNair, J., Pollock, J.M., Lyashchenko, K.P., 2006. Immune responses to defined antigens of *Mycobacterium bovis* in cattle experimentally infected with *Mycobacterium kansasii*. *Clinical and Vaccine Immunology* 13, 611-619.
- Waters, W.R., Nonnecke, B.J., Olsen, S.C., Palmer, M.V., 2007. Effects of pre-culture holding time and temperature on interferon-gamma responses in whole blood cultures from *Mycobacterium bovis*-infected cattle. *Veterinary Microbiology* 119, 277-282.
- Waters, W.R., Buddle, B.M., Vordermeier, H.M., Gormley, E., Palmer, M.V., Thacker, T.C., Bannantine, J.P., Stabel, J.R., Linscott, R., Martel, E., Milian, F., Foshaug, W., Lawrence, J.C., 2011a. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for use in the detection of bovine tuberculosis in cattle. *Clinical and Vaccine Immunology* 18, 1882-1888.
- Waters, W.R., Palmer, M.V., Thacker, T.C., Davis, W.C., Sreevatsan, S., Coussens, P., Meade, K.G., Hope, J.C., Estes, D.M., 2011b. Tuberculosis immunity: opportunities from studies with cattle. *Clinical and developmental Immunology* 2011, 768542.
- Waters, W.R., Stevens, G.E., Schoenbaum, M.A., Orloski, K.A., Robbe-Austerman, S., Harris, N.B., Hall, S.M., Thomsen, B.V., Wilson, A.J., Brannian, R.E., Nelson, J.T., Schafer, S., Esfandiari, J., Dutton, M., Greenwald, R., Lyashchenko, K.P., 2011c. Bovine tuberculosis in a nebraska herd of farmed elk and fallow deer: a failure of the tuberculin skin test and opportunities for serodiagnosis. *Veterinary Medicine International* 2011, 953985.
- Waters, W.R., Palmer, M.V., Buddle, B.M., Vordermeier, H.M., 2012. Bovine tuberculosis vaccine research: Historical perspectives and recent advances. *Vaccine* 30, 2611-2622.
- Waters, W.R., Vordermeier, H.M., Rhodes, S., Khatri, B., Palmer, M.V., Maggioli, M.F., Thacker, T.C., Nelson, J.T., Thomsen, B.V., Robbe-Austerman, S., Bravo García, D.M., Schoenbaum, M.A., Camacho, M.S., Ray, J.S., Esfandiari, J., Lambotte, P., Greenwald, R., Grandison, A., Sikar-Gang, A., Lyashchenko, K.P., 2017. Potential for rapid antibody detection to identify tuberculous cattle with non-reactive tuberculin skin test results. *BMC Veterinary Research* 13, 164.
- Wedlock, D.N., Aldwell, F.E., Keen, D.L., 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, 301-306.
- Welaga, P., Debuur, C., Aaby, P., Hodgson, A., Azongo, D.K., Benn, C.S., Oduro, A.R., 2018. Is the decline in neonatal mortality in northern Ghana, 1996-2012, associated with the decline in the age of BCG vaccination? An ecological study. *BMJ Open* 8, e023752.

- Welsh, M.D., Cunningham, R.T., Corbett, D.M., Girvin, R.M., McNair, J., Skuce, R.A., Bryson, D.G., Pollock, J.M., 2005. Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Immunology* 114, 101-111.
- Weniger, T., Krawczyk, J., Supply, P., Niemann, S., Harmsen, D., 2010. MIRU-VNTRplus: a web tool for polyphasic genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria. *Nucleic Acids Research* 38, W326-W331.
- Whelan, C., Shuralev, E., O'Keeffe, G., Hyland, P., Kwok, H.F., Snoddy, P., O'Brien, A., Connolly, M., Quinn, P., Groll, M., Watterson, T., Call, S., Kenny, K., Duignan, A., Hamilton, M.J., Buddle, B.M., Johnston, J.A., Davis, W.C., Olwill, S.A., Clarke, J., 2008. Multiplex immunoassay for serological diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *Clinical and Vaccine Immunology* 15, 1834-1838.
- Whelan, C., Whelan, A.O., Shuralev, E., Kwok, H.F., Hewinson, G., Clarke, J., Vordermeier, H.M., 2010. Performance of the Enferplex TB assay with cattle in Great Britain and assessment of its suitability as a test to distinguish infected and vaccinated animals. *Clinical and Vaccine Immunology* 17, 813-817.
- WHO, Ebola Response Team, 2014. Ebola Virus Disease in West Africa - The First 9 Months of the Epidemic and Forward Projections. *New England Journal of Medicine* 371, 1481-1495.
- WHO, Smallpox, 2018. <https://www.who.int/csr/disease/smallpox/en/>
- WHO, World Health Organization, 2018. BCG vaccine: WHO position paper, February 2018 - Recommendations. *Vaccine* 36, 3408-3410.
- Wiker, H.G., 2009. MPB70 and MPB83--major antigens of *Mycobacterium bovis*. *Scandinavian Journal of Immunology* 69, 492-499.
- Wikipedia, 2019. Historia de la Tuberculosis. https://es.wikipedia.org/wiki/Historia_de_la_tuberculosis (accessed 21 September 2019).
- Willeberg, P.W., McAloon, C.G., Houtsma, E., Higgins, I., Clegg, T.A., More, S.J., 2018. The herd-level sensitivity of abattoir surveillance for bovine tuberculosis: simulating the effects of current and potentially modified meat inspection procedures in Irish cattle. *Frontiers in Veterinary Science* 5, 82.
- Williams, R.S., Hoy, W.A., 1930. The viability of *B. tuberculosis (Bovinus)* on pasture land, in stored faeces and in liquid manure. *The Journal of Hygiene* 30, 413-419.
- Wood, P.R., Jones, S.L., 2001. BOVIGAM: an in vitro cellular diagnostic test for bovine tuberculosis. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)* 81, 147-155.
- Wood, P., Corner, L., Rothel, J., Baldock, C., Jones, S., Cousins, D., McCormick, B., Francis, B., Creeper, J., Twedde, N., 1991. Field comparison of the interferon-gamma assay and the intradermal tuberculin test for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Australian Veterinary Journal* 68, 286-290.
- Wu, S., Ren, S., Nguyen, L., Adams, J.S., Hewison, M., 2007. Splice variants of the CYP27b1 gene and the regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D3 production. *Endocrinology* 148, 3410-3418.
- Yates, G.F., Price-Carter, M., Bland, K., Joyce, M.A., Khan, F., Surrey, M., de Lisle, G.W., 2017. Comparison of the BBL mycobacteria growth indicator tube, the BACTEC 12B, and solid media for the isolation of *Mycobacterium bovis*. *The Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 29, 508-512.

- Young, J.S., Gormley, E., Wellington, E.M.H., 2005. Molecular detection of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium bovis* BCG (Pasteur) in soil. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 1946-1952.
- Zanardi, G., Boniotti, M.B., Gaffuri, A., Casto, B., Zanoni, M., Pacciarini, M.L., 2013. Tuberculosis transmission by *Mycobacterium bovis* in a mixed cattle and goat herd. *Research in Veterinary Science* 95, 430-433.
- Zanella, G., Duvauchelle, A., Hars, J., Moutou, F., Boschiroli, M. L., Durand, B., 2008. Patterns of lesions of bovine tuberculosis in wild red deer and wild boar. *Veterinary Record* 163, 43-47.
- Zhang, J., Zhang, G.H., Yang, L., Huang, R., Zhang, Y., Jia, K., Yuan, W., Li, S.J., 2011. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of *Mycobacterium bovis*. *The Veterinary Journal* 187, 393-396.
- Zhu, R.Y., Zhang, K.X., Zhao, M.Q., Liu, Y.H., Xu, Y.Y., Ju, C.M., Li, B., Chen, J.D., 2009. Use of visual loop-mediated isothermal amplification of rimM sequence for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. *Journal of Microbiological Methods* 78, 339-343.
- Zhu, Z.Y., Zhang, D., Wang, H.B., Xiao, J.Z., Qiu, Y.F., Yan, L., Chen, D., Liu, A.G., Yang, X., 2014. Expression and serological diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* CFP-10 and Rv2626c proteins. *Genetics and Molecular Research* 13, 7398-7406.
- Zumárraga, M.J., Meikle, V., Bernardelli, A., Abdala, A., Tarabla, H., Romano, M.I., Cataldi, A., 2005. Use of touch-down polymerase chain reaction to enhance the sensitivity of *Mycobacterium bovis* detection. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 17, 232-238.

