



# **TUBERCULOSIS ANIMAL:** **INVESTIGACIÓN Y CONTROL** **EN ESPAÑA**

**EDITORES:**  
Ana Balseiro Morales  
Christian Gortázar Schmidt





# **Tuberculosis animal: investigación y control en España**

---

**Editores:**

*Ana Balseiro Morales*

*Christian Gortázar Schmidt*

© Edita: Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA)  
Consejería de Desarrollo Rural y Recursos Naturales del Principado de Asturias

© Editores: Ana Balseiro Morales y Christian Gortázar Schmidt

© Texto: Autores

© Fotografías: Autores

Coordinación editorial: M<sup>a</sup> del Pilar Oro García

Imprime y encuaderna: Gráficas Eujoa S.A.

Diseño cubierta: Juan Hernaz

Diseño y maquetación: lloviendolettras

ISBN: 978-84-608-2028-4

Depósito Legal: AS 2408-2015

Impreso en España, Printed in Spain

# ÍNDICE

---

Prólogo .....	9
Introducción	
<i>Ana Balseiro, José Miguel Prieto, Marta Muñoz Mendoza,     José Luis Sáez, Christian Gortázar</i> .....	11
I+D sobre tuberculosis animal	
1. Estrategias de control de la tuberculosis bovina en zonas atlánticas, y clasificadas como de baja prevalencia. <i>Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario     del Principado de Asturias (SERIDA)</i> .....	25
2. Desarrollo de vacunas y herramientas de diagnóstico para el control de la tuberculosis. <i>Centre de Recerca en Sanitat Animal (IRTA-CReSA)</i> .....	31
3. Fauna salvaje y tuberculosis en Cataluña: conocimiento actual y perspectivas. <i>Servei d'Ecopatologia de Fauna Salvatge, Universidad Autónoma de Barcelona     (SEFaS/UAB)</i> .....	35
4. Estudios sobre la epidemiología de la tuberculosis bovina en España. <i>IRTA-CReSA/UAB</i> .....	39
5. Ensayos multiespecie para la detección serológica de <i>M. bovis</i> . <i>Inmunología y Genética Aplicada S.A. (INGENASA)</i> .....	43
6. La tuberculosis animal: una infección multi-hospedador. <i>Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos (SaBio-IREC)</i> .....	49
7. Conocimiento y manejo de la interacción entre el ganado extensivo y la fauna silvestre. <i>SaBio-IREC</i> .....	57
8. Vacunación. <i>Consorcio SaBio-IREC/NEIKER/VISAVET</i> .....	63

9. Las micobacteriosis, una constante en la medicina veterinaria de Bizkaia durante más de 60 años. <i>Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (NEIKER-Tecnalia)</i> .....	69
10. Estrategias para la mejora de la eficacia de los métodos de diagnóstico en las campañas de saneamiento de tuberculosis caprina. <i>Universidad de Murcia (UM)</i> .....	75
11. Estudios epidemiológicos de la tuberculosis bovina en especies domésticas y silvestres en el sur de España. <i>Universidad de Córdoba (UCO)</i> .....	79
12. La tuberculosis bovina como modelo para el control integral de la Sanidad Animal en entornos extensivos. <i>Universidad de Extremadura (PATIN-UJEX)</i> .....	85
13. Diagnóstico de la tuberculosis bovina. <i>Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid (VISAVET)</i> .....	91
14. Herramientas epidemiológicas para controlar la tuberculosis bovina. <i>VISAVET</i> .....	97
15. Programa de erradicación de la tuberculosis caprina en Castilla y León. <i>Junta de Castilla y León/VISAVET</i> .....	101
16. Evaluación de la red de movimientos de ganado bovino en Castilla y León para la identificación de factores asociados con la transmisión de tuberculosis bovina y el desarrollo de herramientas de trazabilidad en explotaciones infectadas. <i>Junta de Castilla y León/VISAVET</i> .....	107
17. Importancia de la tuberculosis bovina en humanos: desde los datos epidemiológicos a la caracterización molecular. <i>Universidad de Zaragoza (UNIZAR)</i> .....	113
18. Nuevos enfoques para el estudio de la transmisión del complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en sistemas multi-hospedador. <i>Life and Health Sciences Research Institute (ICVS/CIBIO)</i> .....	119
<b>Conclusiones y perspectivas futuras: bases para el control</b> <i>Ana Balseiro, Bernat Pérez de Val, Lucía de Juan, Christian Gortázar</i> .....	123
<b>Referencias bibliográficas</b> .....	133
<b>Anexo I: Objetivos inmediatos y beneficios de la investigación española en tuberculosis animal</b> .....	148
<b>Anexo II: Lista de investigadores</b> .....	155

## ***Agradecimientos***

Este libro y “I Workshop Nacional de Investigación en Tuberculosis Animal” han sido financiados por la Acción Complementaria AC2014-00004-00-00 del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), dentro del Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación 2013-2016, por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER) y por el Ayuntamiento de Gijón, a través de Divertia. También ha contado con la colaboración de Zerep Carbónicas y Aguas S.A.

Agradecer al Comité Científico y al Comité Organizador su inestimable ayuda en la organización del evento, y a todos los colaboradores y autores de este libro, porque sin ellos no hubiera sido posible su realización. En especial gracias al Área de Sanidad Animal, al Departamento de Investigación, al Departamento Tecnológico y de Servicios y Área de Transferencia y Formación del SERIDA.



## PRÓLOGO

---

El **I Workshop Nacional de Investigación en Tuberculosis Animal** que tendrá lugar en Gijón los próximos días 17 y 18 de septiembre será un espacio único para mejorar nuestro conocimiento sobre esta epizootia e incluirá los avances científicos más recientes y la investigación básica y aplicada.

Por este motivo es muy grato para mí, como Consejera de Desarrollo Rural y Recursos Naturales, presentar las comunicaciones y trabajos que serán objeto de exposición y discusión.

El Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario (SERIDA) –a través del Área de Sanidad Animal y en colaboración con otras entidades entre las que quiero destacar al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA)– ha diseñado un completo programa con el objetivo de facilitar el debate y el intercambio, tanto de los avances técnicos que se vienen produciendo en los estudios sobre la tuberculosis animal, como las novedades en la investigación. Además este encuentro quiere ser un foro abierto al análisis de las cuestiones más importantes relacionadas con la enfermedad con el objetivo de seguir avanzando y dar respuesta a los retos que tenemos que abordar de forma inmediata.

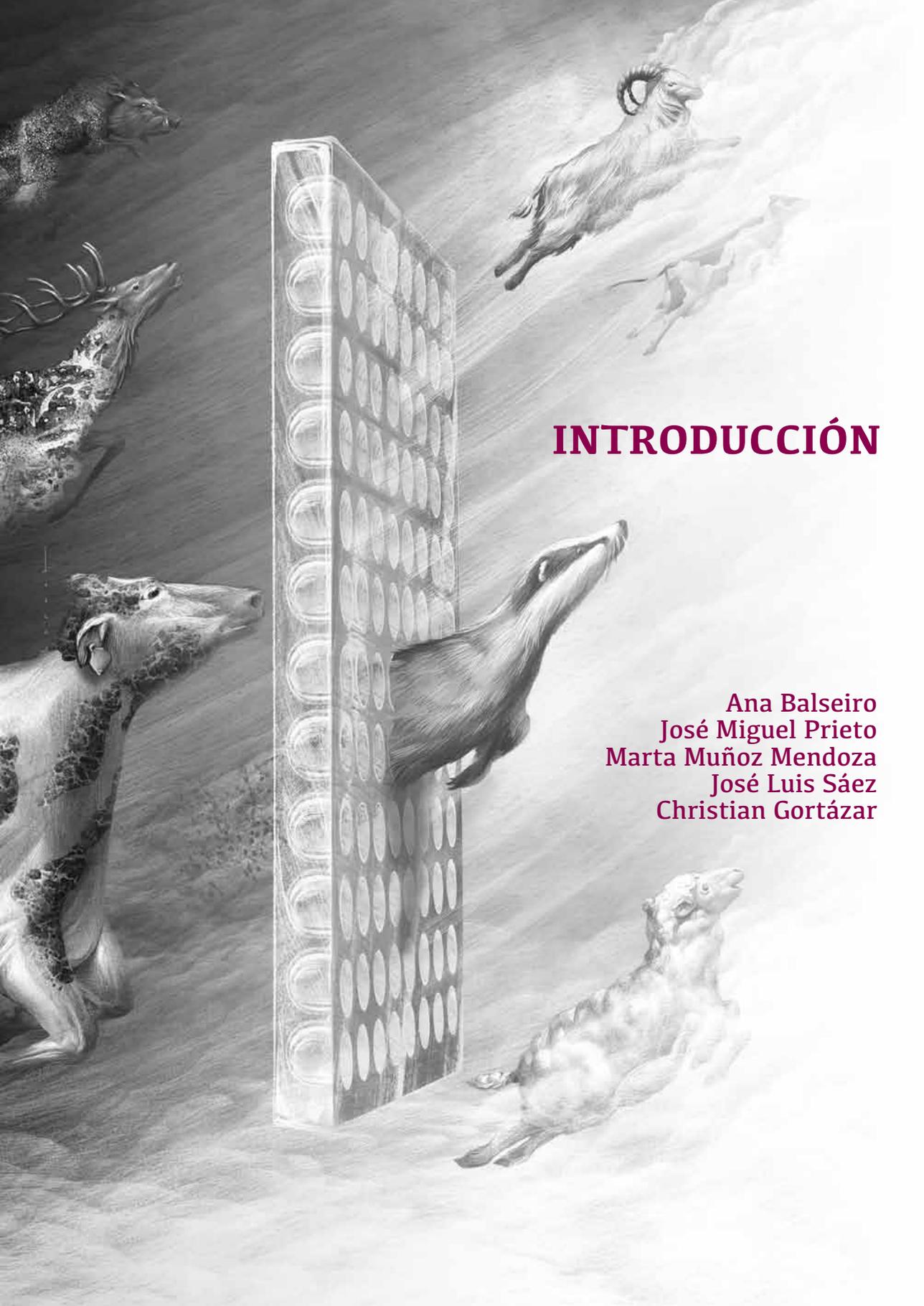
Este **I Workshop** pretende no solo contribuir al intercambio del conocimiento técnico y científico sino promover un diálogo fluido y eficaz entre todos los agentes implicados: investigadores, técnicos, administración y ganaderos, que permita avanzar significativa y cualitativamente en el conocimiento de la enfermedad.

Para ello, por una parte se ha procedido a la recopilación y publicación resumida de todo el conocimiento aportado por la práctica totalidad de grupos científicos nacionales que trabajan desde hace años en la investigación de la tuberculosis animal, con la participación de expertos de otros países (Reino Unido, Francia y Portugal). Por otra, se ha programado este encuentro en el que investigadores y técnicos compartirán sesiones científicas y mesas redondas específicas que, partiendo del conocimiento adquirido, nos permitan alcanzar nuevas ideas y propuestas. Finalmente, los aspectos más importantes de estas reuniones científicas se darán a conocer en una jornada abierta en la que está previsto que participen ganaderos, técnicos y gestores públicos. En ella se conocerán las primeras conclusiones, que han de constituir un punto de partida para seguir trabajando, de forma coordinada, con el objetivo compartido de atajar la tuberculosis y resolver los problemas que genera, tanto a nivel regional como nacional e internacional, para beneficio del conjunto de la sociedad.

Asturias no se entiende sin su medio rural, sin las gentes que lo componen y que contribuyen cada día a su sostenimiento. Tampoco se entiende sin la riqueza que conforman sus valiosos recursos naturales. Nuestro desarrollo económico, ambiental y sociocultural estará lastrado sin una agricultura y ganadería prósperas.

Este encuentro científico quiere ser una ventana abierta al conocimiento y al progreso porque estamos convencidos de que cuando ponemos la ciencia al servicio de la sociedad para resolver los diferentes problemas que nos afectan, se producen avances que hacen nuestra vida más fácil y nuestra sociedad más próspera.

María Jesús Álvarez González  
***Consejera de Desarrollo Rural y Recursos Naturales  
del Principado de Asturias***



# INTRODUCCIÓN

Ana Balseiro  
José Miguel Prieto  
Marta Muñoz Mendoza  
José Luis Sáez  
Christian Gortázar



### **¿Qué es la tuberculosis animal?**

La tuberculosis animal es una enfermedad infecto-contagiosa granulomatosa crónica que afecta a diversos mamíferos domésticos y silvestres y muy excepcionalmente a aves. Está producida por especies pertenecientes al complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMT), principalmente *M. bovis* y *M. caprae* (Grange et al. 1990). *Mycobacterium bovis* combina una de las más amplias gamas de hospedadores de todos los agentes patógenos, con un complejo modelo epidemiológico que engloba interacciones entre personas, animales domésticos y animales salvajes (Galagan 2014).

### **¿Es importante para el ser humano?**

La tuberculosis se sitúa dentro de las enfermedades más importantes a nivel mundial. Se estima que causa una media de 8,8 millones de nuevos casos de enfermedad en humanos y 1,5 millones de muertes anuales (Müller et al. 2013). La mayor parte de estos casos están producidos por el patógeno humano *M. tuberculosis* (también perteneciente a CMT). Sin embargo, en determinados países, sobre todo los menos desarrollados, *M. bovis* tiene un papel importante. Además, las infecciones por *M. bovis* en humanos son frecuentemente extrapulmonares. En África el 2,8% de los casos en humanos está producido por *M. bovis* (Müller et al. 2013). La infección del ser humano en estos países ocurre principalmente a través del contacto estrecho con ganado infectado y por el consumo de productos animales contaminados, como es la leche sin pasteurizar (Ayele et al. 2004). Los patógenos animales, como *M. bovis* y *M. caprae*, tienen una capacidad muy limitada para transmitirse de humano a humano (Gonzalo-Asensio et al. 2014). Igualmente, experimentos no publicados de VISAVET y SaBio-IREC indican que el patógeno humano *M. tuberculosis* es menos eficaz en los hospedadores animales.

### **¿Qué papel tiene el ganado doméstico y la fauna silvestre?**

La tuberculosis animal tiene una incidencia mundial todavía muy importante, observándose en la mayoría de los países pese a las numerosas y largas campañas de erradicación que se han llevado a cabo en muchos de ellos, incluyendo España (Figura 1).



**Figura 1.** La interacción entre especies domésticas y silvestres es importante en España, siendo las infecciones compartidas entre el ganado doméstico y la fauna silvestre uno de los retos actuales más importantes de las autoridades sanitarias. (Foto: SERIDA, Raúl González)

El ganado vacuno se considera el principal hospedador de la tuberculosis animal. Sin embargo, el caprino, el ovino y el porcino han demostrado ser hospedadores eficientes en cuanto al mantenimiento de la tuberculosis. Asimismo, son muchos los animales silvestres reconocidos como reservorios a nivel mundial. Entre ellos se encuentran el ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*), el wapití (*Cervus elaphus*), el bisonte (*Bison* sp) y el cerdo salvaje en Norteamérica (Wobeser 2009; Miller y Sweeney 2013); el búfalo africano (*Syncerus caffer*), el kudu (*Tragelaphus strepsiceros*), el antílope Lechwe (*Kobus leche*) y el facocero común (*Phacochoerus africanus*) en el África subsahariana (Hlokwe et al. 2014); la zarigüeya (*Trichosorus vulpecula*) en Nueva Zelanda (Corner 2006); el bisonte europeo en Polonia (Krajewska et al. 2015), el tejón (*Meles meles*) en Reino Unido e Irlanda (Gormley y Corner 2013; Murphy et al. 2014), y el jabalí (*Sus scrofa*), el ciervo (*Cervus elaphus*) y el gamo (*Dama dama*) en la Península Ibérica (Gortázar et al. 2011a).

No obstante, es importante recordar que los reservorios de tuberculosis se desconocen casi por completo en el sur de América, norte de África y Asia. Además, aunque la mera presencia de una especie potencialmente hospedadora no implica el establecimiento de un reservorio silvestre, son necesarios mayores esfuerzos de investigación para clarificar el papel de la fauna silvestre en la epidemiología de la tuberculosis en muchas otras regiones, incluso en países desarrollados (Gortázar et al. 2015).

## ¿Cuál es la situación en la fauna silvestre en España?

En España el papel que la fauna silvestre está teniendo en el mantenimiento de la tuberculosis en los ambientes mediterráneos ha sido muy estudiado (Gortázar et al. 2011a, Figuras 2 y 3). Se ha comprobado que en este medio existen ungulados, principalmente jabalíes, ciervos y gamos, que mantienen la tuberculosis incluso en ausencia de ganado bovino, siendo las prevalencias medias superiores al 50% en los jabalíes y 15% en los ciervos (Vicente et al. 2013).



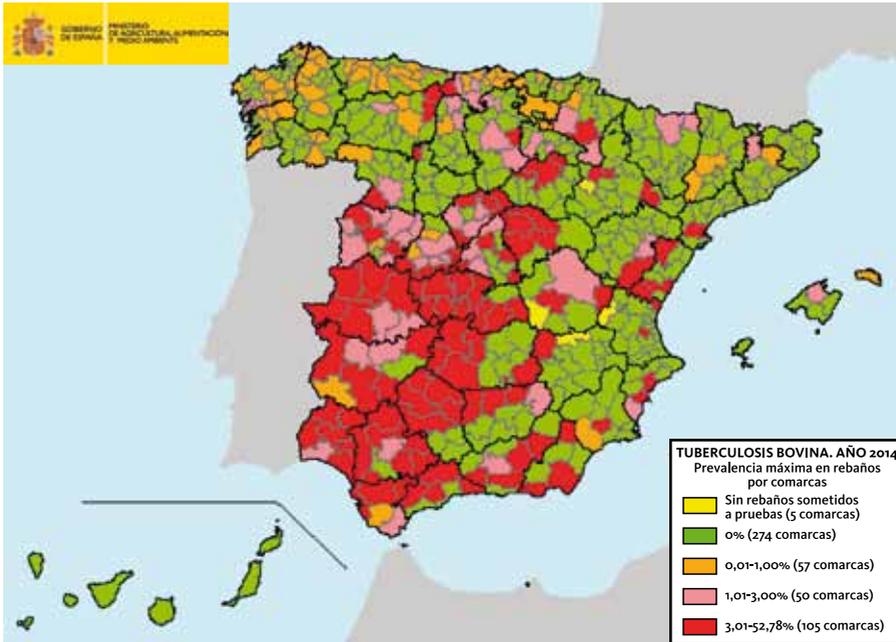
**Figura 2.** En los ambientes mediterráneos del centro y sur de la Península Ibérica, el jabalí es un componente importante de la comunidad de hospedadores que mantiene el complejo *M. tuberculosis*. Estas comunidades (o reservorios) son tanto más estables (y por tanto difíciles de controlar) cuantas más especies domésticas (bovinos, caprinos, porcinos) y silvestres (jabalí, ciervo, gamo, tejón) las integren. (Foto: SaBio-IREC)

En el norte de la Península Ibérica, con una climatología atlántica muy diferente del resto, la situación de la tuberculosis en la fauna silvestre es también muy distinta a la del área mediterránea. Como ejemplo, el jabalí presenta una prevalencia de tuberculosis en Galicia y Asturias de un 2,6%, siendo esta especie sin embargo un buen indicador de la circulación de CMT (Muñoz Mendoza et al. 2013). En cambio, el tejón podría tener un papel importante en el mantenimiento de CMT en la España atlántica (Balseiro et al. 2013).



**Figura 3.** Pulmón y riñón de un tejón con tuberculosis generalizada. El tejón puede ser localmente relevante como parte de la comunidad de hospedadores del complejo *M. tuberculosis*, sobre todo en la España atlántica. (Fotos: SaBio-IREC)

Para entender estas diferencias epidemiológicas en la fauna silvestre hay que tener en cuenta tres factores fundamentales: (1) la prevalencia de rebaño de la tuberculosis en el ganado bovino es mucho mayor en el centro y sur de España que en el norte de la península (Figura 4), lo que favorecería la transmisión de la infección desde el ganado bovino a la fauna silvestre, (2) la agregación de los ungulados silvestres (y domésticos) en torno a puntos de agua o de alimentación, y las situaciones de sobreabundancia de ungulados silvestres, son más frecuentes en el centro y sur de la península y, (3) el manejo de la fauna silvestre en ambas regiones es muy dispar. Mientras que en el norte de la península existen principalmente poblaciones naturales, en ambientes mediterráneos el manejo artificial a través de la suplementación de alimento y agua y el vallado, así como los traslados, son prácticas habituales. Esta situación favorece el contacto entre animales y la transmisión de la infección.



**Figura 4.** Prevalencia de la tuberculosis animal en España en rebaños de ganado bovino en el año 2014. Obsérvese la mayor prevalencia en el cuadrante suroccidental, que coincide con ambientes mediterráneos con abundancia de ungulados silvestres y presencia de otros factores de riesgo, como la escasez de agua. Fuente: MAGRAMA.

### ¿Por qué no se ha erradicado la tuberculosis bovina?

En el estado actual de erradicación de la tuberculosis animal, las pérdidas más importantes son debidas a la inmovilización y sacrificio de los animales, siendo muy considerables las pérdidas indirectas. El control de la tuberculosis es difícil por varias razones (Figura 5). De acuerdo con el Informe Técnico del MAGRAMA sobre la aplicación del Programa Nacional de Erradicación de la tuberculosis bovina 2014 ([http://rasve.magrama.es/Recursos/Ficheros/Historico/62\\_INFORME%20FINAL%20TÉCNICO%20TB%202014.pdf](http://rasve.magrama.es/Recursos/Ficheros/Historico/62_INFORME%20FINAL%20TÉCNICO%20TB%202014.pdf)), en 2014 se ha producido un marcado retroceso en la evolución de la lucha frente a la enfermedad. Las evaluaciones preliminares (Guta et al. 2014b) parecen indicar como principal causa el incremento de la sensibilidad diagnóstica que está haciendo aflorar la infección residual, principal factor de riesgo en España (elevado número de pruebas de gamma-interferón realizadas en rebaños infectados, realización de los cursos y pruebas de validación para los veterinarios de campo en 2012-2014 y aumento de los controles oficiales sobre estos veterinarios). Además, se alude al creciente papel como reservorio de la fauna silvestre en determinadas zonas.

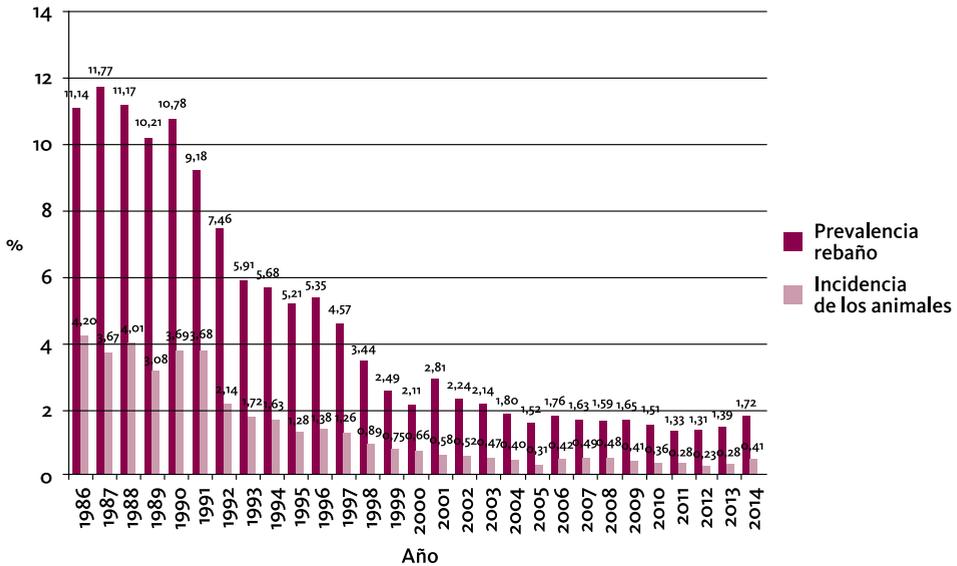


**Figura 5.** El principal reservorio de la tuberculosis para el ganado bovino lo sigue constituyendo el propio ganado bovino. Basta observar cómo a mayor formación y mayor control de los veterinarios de campo, hay una mayor detección de bovinos positivos. La seriedad en la aplicación de los criterios de testado y eliminación en bovinos es una de las claves del éxito o fracaso del programa de erradicación. (Foto: SaBio – IREC)

### ***¿En qué consiste el Plan Nacional de Erradicación de la Tuberculosis Bovina (PNETB)?***

El Programa Nacional de Erradicación de la Tuberculosis Bovina (PNETB) presentado por España a la Comisión Europea para su cofinanciación, se elabora por el Grupo de Trabajo de la Tuberculosis y la Brucelosis Bovina compuesto por expertos de las diferentes Comunidades Autónomas (CCAA), y se coordina y gestiona desde el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA).

El PNETB tiene como objetivo final la erradicación de la enfermedad en el país. Actualmente, en Europa, los Estados Miembros con programas de erradicación aprobados y cofinanciados por la Unión Europea son Croacia, España, Irlanda, Italia, Portugal y Reino Unido. España presentó su primer programa de erradicación en 1987. La prevalencia de tuberculosis en rebaños de ganado bovino era, en ese momento, del 11,14%. A finales de 2013, los valores de prevalencia de tuberculosis habían descendido a 1,39% (Red de Alerta Sanitaria Veterinaria-RASVE, 2014; Figura 6).



**Figura 6.** Gráfico que muestra la evolución de la tuberculosis a nivel de rebaño y de individuo en España desde el año 1986 hasta el 2014. Fuente: MAGRAMA.

El objetivo inmediato del programa es lograr un rápido aumento del porcentaje de rebaños oficialmente indemnes, para poder avanzar hacia el reconocimiento de regiones oficialmente indemnes, paso previo a la erradicación final. El estatus de región/país oficialmente indemne a tuberculosis bovina se alcanza cuando, durante 6 años consecutivos, la prevalencia de rebaños infectados es inferior al 0,1% y al menos un 99,9% de los rebaños son oficialmente indemnes.

Los objetivos parciales del programa son reducir la persistencia de la enfermedad en el rebaño, reducir el riesgo de contracción de la enfermedad, proteger las zonas de prevalencia cero existentes, aumentar la sensibilidad diagnóstica, cumplir las directrices de la Unión Europea a este respecto para España y adoptar las recomendaciones aportadas por los expertos del subgrupo de Tuberculosis Bovina de la “Task Force for monitoring disease eradication” y por las Misiones de la FVO (*Food and Veterinary Office-European Commission*).

El programa nacional establece medidas basadas en el riesgo existente, diferenciando las actuaciones a realizar en las CCAA de prevalencia cero (Canarias), CCAA de baja prevalencia/prevalencia menor del 1% (Aragón, Asturias, Baleares, Cantabria, Cataluña, Galicia, La Rioja, Navarra y País Vasco, Tabla 1) y CCAA de alta prevalencia/prevalencia mayor del 1% (Andalucía, Castilla La Mancha, Castilla y León, Extremadura, Madrid, Murcia y Valencia, Tabla 1). El programa también establece medidas comunes para todas las CCAA, relativas al uso de gamma-Interferón, chequeos previos al movimiento, vigilancia en fauna silvestre, control en el acceso a pastos de aprovechamiento común, control de rebaños de ganado caprino, asesoramiento científico, sistemas de vigilancia en mataderos, control de equipos de campo y actividades del grupo de análisis epidemiológicos.

**Tabla 1.** Comparativa de prevalencias de tuberculosis desde el año 2001 hasta el 2014 en CCAA de baja prevalencia (A) y en CCAA de alta prevalencia (B). Fuente: MAGRAMA.

## A) CCAA de baja prevalencia

CC.AA.	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Aragón	3,74	3,14	2,75	2,03	1,56	1,96	3,65	0,75	0,70	1,22	1,62	1,38	0,71	0,58
Baleares	0,82	0,92	1,02	0,65	0,65	0,22	0,21	0,00	0,00	0,17	0,00	0,40	0,60	0,41
Canarias	0,53	0,34	1,05	2,40	1,00	0,36	0,37	0,24	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Asturias	0,30	0,32	0,22	0,24	0,18	0,17	0,24	0,22	0,21	0,18	0,14	0,19	0,20	0,21
Cataluña	3,09	1,93	1,74	1,78	1,70	1,65	1,08	0,85	0,83	0,59	0,81	0,25	0,04	0,16
Cantabria	0,73	1,00	1,34	1,41	1,16	1,05	2,25	1,57	0,91	0,79	0,74	0,89	0,88	0,70
Navarra	0,60	0,52	0,82	0,36	0,38	0,27	0,33	0,40	0,30	0,67	0,65	0,30	0,66	0,67
Galicia	0,56	0,52	0,43	0,46	0,31	0,20	0,19	0,11	0,22	0,28	0,19	0,21	0,12	0,11
La Rioja	2,70	2,05	2,70	2,76	1,31	0,72	0,70	1,45	0,75	1,14	0,38	0,36	0,37	0,72
País Vasco	0,16	0,06	0,17	0,22	0,64	0,19	0,14	0,20	0,57	0,37	0,33	0,25	0,17	0,25
Murcia	9,02	5,79	1,48	7,59	4,46	4,96	8,05	3,29	3,51	1,59	0,33	1,40	1,84	0,94
España	2,81	2,24	2,14	1,80	1,52	1,76	1,63	1,59	1,65	1,51	1,33	1,31	1,39	1,72

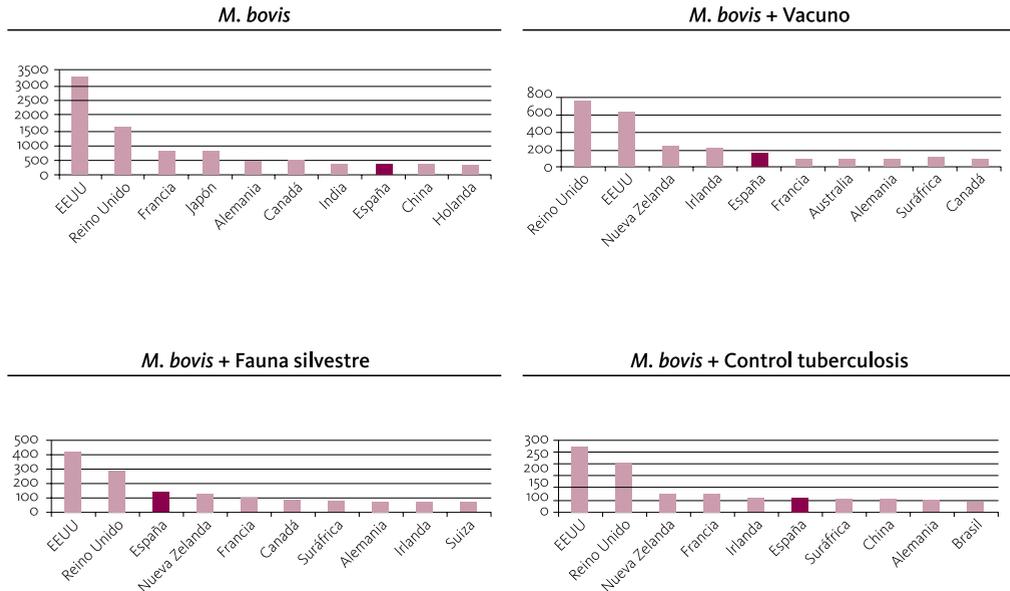
## B) CCAA de alta prevalencia

CC.AA.	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
Castilla-La Mancha	8,80	7,69	3,36	7,19	7,02	7,71	9,51	11,62	10,27	7,11	5,35	3,54	3,33	7,21
Castilla y León	5,21	5,10	5,66	3,78	3,37	5,11	4,16	3,71	2,75	2,62	2,57	2,66	2,88	2,22
Extremadura	8,69	7,45	5,95	5,57	4,05	4,84	3,74	3,37	3,78	3,04	3,11	3,29	4,53	4,62
Madrid	8,04	3,69	3,92	1,99	2,58	2,59	3,41	5,72	5,54	5,45	7,22	6,13	4,51	3,55
Andalucía	12,32	9,65	8,47	6,73	5,32	5,76	4,15	5,80	8,94	8,54	6,16	5,69	5,94	11,51
Valencia	25,22	12,47	5,56	2,63	2,16	1,61	1,14	1,41	1,38	3,84	1,94	1,55	2,88	3,06
España	2,81	2,24	2,14	1,80	1,52	1,76	1,63	1,59	1,65	1,51	1,33	1,31	1,39	1,72

## ¿Cuál es el trabajo de los grupos españoles de investigación en tuberculosis animal?

Son muchos los grupos de investigación nacionales que llevan años trabajando en intentar dar soluciones factibles al problema de la tuberculosis animal desde diferentes facetas (epidemiología, diagnóstico, control...). España es un líder internacional en producción científica sobre tuberculosis, situándose en el puesto número ocho (Figura 7). El I Workshop Nacional de Investigación en Tuberculosis Animal debe ser un marco de partida ideal para potenciar y reforzar una mayor participación y consolidación de nuestro país en programas de investigación internacionales. Además, tanto en el desarrollo de capacidades, como en la internacionalización se requiere una mayor interacción con los diferentes sectores y con la industria. Con la premisa de una intensa cooperación científica entre grupos, se pretende establecer grupos de trabajo especializados en temáticas concretas, que podrán trabajar en conjunto para unir recursos y plantear solicitudes competitivas a próximos programas europeos. Para ello se presentan a continuación los hitos y objetivos inmediatos de los diferentes grupos de investigación españoles en tuberculosis animal, que afrontan la tuberculosis desde diferentes enfoques:

- Evaluación y desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas
- Estudios experimentales de vacunación con nuevos productos vacunales más seguros
- Epidemiología aplicada al desarrollo de sistemas de bioseguridad y gestión de las explotaciones



**Figura 7.** Producción científica sobre tuberculosis a nivel internacional. En el gráfico superior aparece el total de la producción científica (13415 trabajos) situándose España en la posición número 8 (379 trabajos, en granate). Los siguientes tres gráficos reflejan la producción por temáticas (Fuente: Scopus, consultas realizadas en mayo de 2015).





**I+D SOBRE  
TUBERCULOSIS  
ANIMAL**



# 1. ESTRATEGIAS DE CONTROL DE LA TUBERCULOSIS BOVINA EN ZONAS ATLÁNTICAS, Y CLASIFICADAS COMO DE BAJA PREVALENCIA

*Servicio Regional de Investigación y Desarrollo Agroalimentario del Principado de Asturias (SERIDA)*

Contacto: Ana Balseiro (abalseiro@serida.org)

## **Historia**

El Área de Sanidad Animal del SERIDA ([www.serida.org](http://www.serida.org)) viene trabajando desde hace más de una década en las medidas de control y erradicación de la tuberculosis animal. El primer reto que se planteó fue determinar si la paratuberculosis, en sus diferentes formas lesionales, podía interferir en la prueba de la tuberculina que se realiza dentro de las campañas oficiales de saneamiento bovino para el diagnóstico de tuberculosis. Se llegó a la conclusión de que únicamente un determinado tipo de lesiones (multifocales y difusas linfocíticas) podían producir cierta interferencia, es decir, resultados dudosos en esta prueba con valores de reacción de entre 2-3 mm (Balseiro et al. 2003).

En los años siguientes se comenzó a trabajar con la fauna silvestre en el marco de dos proyectos de investigación financiados por el INIA (RTA2008-00041 y RTA2011-00010). El objetivo era profundizar en el conocimiento de la tuberculosis en la población silvestre, principalmente el tejón y el jabalí y, clarificar si estas dos especies silvestres podían contribuir a perpetuar la enfermedad en el ganado doméstico en Asturias. Los resultados/información obtenidos permitirían diseñar estrategias de control que disminuyeran la transmisión de la infección al ganado bovino y mejoraran la sanidad animal. Paralelamente, se fueron desarrollando nuevas técnicas de diagnóstico de ELISA e inmunohistoquímica (a través de la fabricación de anticuerpos primarios policlonales) y de RT-PCR.

## **Actualidad**

Se ha comprobado que tanto el tejón como el jabalí presentan infección por tuberculosis en el norte de España, aunque a “baja prevalencia”, y que podrían dar lugar a la

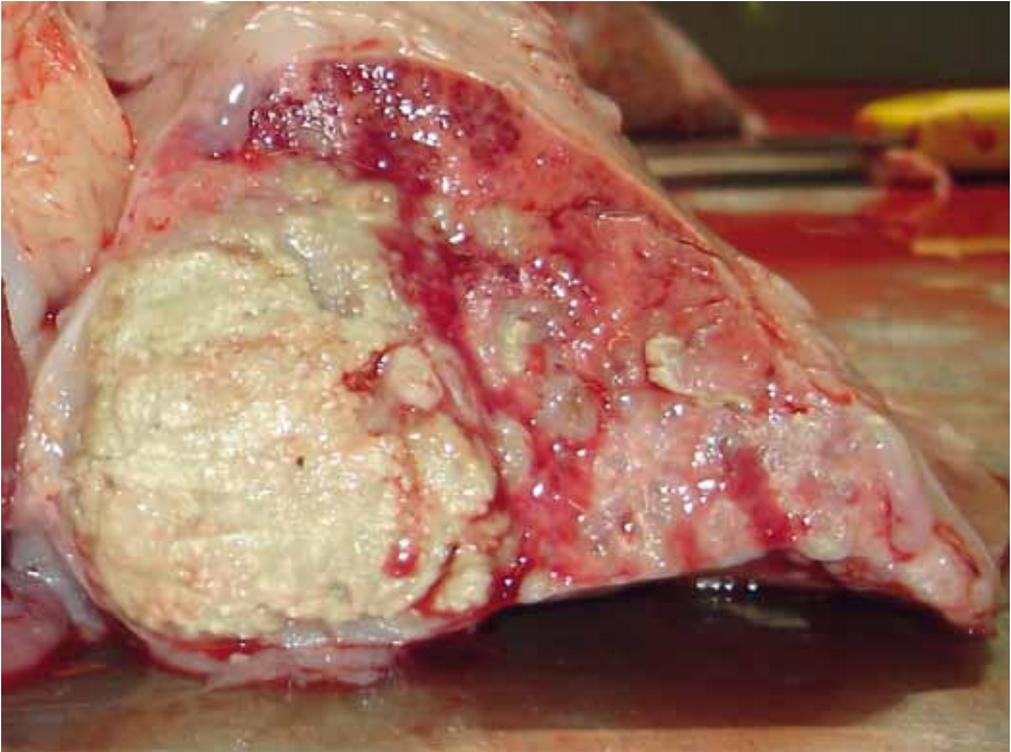
transmisión de la infección al ganado bovino siempre que se produzca un contacto “muy estrecho y directo” interespecies (Balseiro et al. 2011a; 2011b; 2013; Muñoz-Mendoza et al. 2013). Se ha observado mediante fototrampeo cómo los jabalíes y los tejones se alimentan en zonas concretas pastadas por el ganado bovino, posibilitando la transmisión entre especies (Cowie et al. 2014b, Figura 1). Otras especies como el corzo tendrían menos relevancia (Balseiro et al. 2009).



**Figura 1.** Ejemplos de interacción entre diferentes especies en el norte de España utilizando sistemas de fototrampeo, que demuestran el contacto estrecho entre las mismas y la posibilidad de transmisión de la infección. En las imágenes superiores se puede observar al ganado bovino comiendo en la misma zona en la que esa noche aparecen alimentándose los jabalíes. En las dos inferiores se observa un tejón y un jabalí comiendo en el mismo lugar. (Fotos: SERIDA)

Aunque el esfuerzo principal se ha dirigido a estudiar y controlar la tuberculosis en animales silvestres, no se han dejado de lado otras especies domésticas menos estudiadas, como por ejemplo la oveja. Tradicionalmente se ha considerado a la oveja un hospedador menos susceptible a la tuberculosis que otros rumiantes domésticos, de hecho, esta especie no está incluida en el Plan Nacional de Erradicación de la tuberculosis bovina. Nuestros trabajos han descrito numerosos casos de rebaños ovinos infectados. En general, estos rebaños habían convivido con ganado bovino o caprino positivo a tuberculosis, compartiendo las mismas cepas de *Mycobacterium bovis* y *M. caprae* (Muñoz-Mendoza et al. 2012; 2015, Figura 2). Esto significa que se ha estado manteniendo un

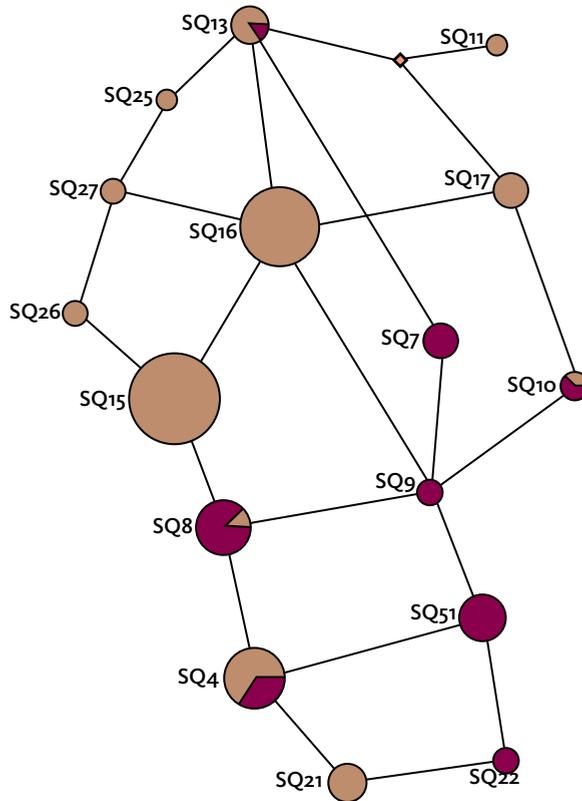
reservorio doméstico en las explotaciones, lo que representa un riesgo potencial para otras especies susceptibles que convivan con él. Adicionalmente se ha podido evaluar la sensibilidad y especificidad de diferentes técnicas diagnósticas en esta especie (Muñoz-Mendoza et al. 2015).



**Figura 2.** Lesión tuberculosa en pulmón en ovino. Se observa una lesión nodular en el lóbulo diafragmático del pulmón con pequeños nódulos satélites que rodean la lesión principal. Es importante resaltar que este tipo de lesiones contienen micobacterias que podrían convertir a los ovinos en posibles transmisores de tuberculosis (Muñoz-Mendoza et al. 2015).

Como estrategia de control alternativa, se está estudiando en paralelo si existe un componente familiar (genético) en la resistencia o susceptibilidad a contraer tuberculosis. Para ello, aprovechando las campañas oficiales de saneamiento ganadero, se muestrearon animales positivos y negativos a la prueba de la tuberculina en ganaderías donde se han llevado a cabo vacíos sanitarios, asumiendo por lo tanto que habiendo estado todos ellos expuestos al contacto con la micobacteria, unos contrajeron la enfermedad y otros no. Estos animales se genotiparon para una colección de marcadores localizados en genes candidatos asociados a la susceptibilidad/resistencia a micobacterias (BoIFNG, TLR4, SCL11A1). Se identificaron varios genotipos asociados tanto a animales sanos como

a animales enfermos (ver Figura 3), lo que sugiere que esta estrategia basada en la selección genética merece ser explorada con más detalle.



**Figura 3.** Diagrama de los 16 genotipos mayoritarios y diferentes encontrados en las muestras estudiadas. Cada genotipo está representando por un círculo cuyo tamaño es proporcional al número de individuos que lo presentan. Dentro de cada uno el color granate identifica a los individuos positivos a tuberculosis, y el marrón a los individuos negativos. Existen genotipos (círculos) compuestos por individuos tanto negativos como positivos, genotipos con solo individuos negativos, y genotipos (5, 7, 9 y 22) que están compuestos únicamente por individuos positivos, lo cual parece indicar la existencia de un componente familiar en la resistencia/susceptibilidad a la enfermedad.

## Futuro

El objetivo general que se nos plantea es establecer estrategias de control de la tuberculosis bovina en el norte de España en comunidades clasificadas como de baja prevalencia de tuberculosis (<1%) según RASVE (2014), pero que soportan unidades veterinarias locales con altas prevalencias de la enfermedad (>4%). En líneas generales se pretende describir los riesgos de transmisión de la tuberculosis entre el ganado bovino, ovino y las especies silvestres, principalmente tejón y jabalí, aplicándolo al desarrollo de protocolos de mitigación del riesgo de transmisión de la enfermedad en el norte de España.

Para ello se desarrollarán los siguientes objetivos:

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

Se marcarán tejones y jabalíes con collares GPS que revelen la interacción con las explotaciones bovinas positivas a tuberculosis en Asturias. Adicionalmente se capturarán tejones con el fin de determinar su estado sanitario.

**2. Establecimiento de una guía de medidas de bioseguridad en las explotaciones ganaderas positivas a tuberculosis.**

Esta guía supondrá una ventaja económica y de gestión muy importante para los ganaderos a través de la prevención.

**3. Estudio del modelo de infección y evaluación de la seguridad y la eficacia de vacunas antituberculosas en corderos desafiados con *M. bovis*.**

Este objetivo permitirá establecer el modelo de infección experimental con *M. bovis* en ovino y evaluar la seguridad y eficacia del prototipo de vacuna inactivada desarrollado en NEIKER frente a la vacuna BCG cepa Pasteur, así como estandarizar la respuesta inmune frente a la vacunación. Todo ello llevará a profundizar en el conocimiento de la tuberculosis en ovino para poder establecer pautas de actuación futuras dentro de las campañas de saneamiento.

**4. Evaluación de la seguridad y la eficacia de vacunas antituberculosas en tejones desafiados con *M. bovis*.**

Este objetivo permitirá determinar la eficacia en tejón del prototipo de vacuna inactivada de *M. bovis*. Su consecución daría lugar a un avance real en la lucha de la tuberculosis en el tejón a nivel internacional. Además supondría un gran avance en la vacunación de tejones en campo debido a que el riesgo biológico de utilizar una vacuna inactivada sería muy bajo.

**5. Estudio del componente familiar en la resistencia o susceptibilidad a contraer la enfermedad.**

La identificación de ciertos genotipos presentes solo en animales positivos avala este tipo de trabajos familiares. El análisis de más marcadores, así como estudios más profundos de asociación de los haplotipos identificados, y su comprobación en otras poblaciones animales diferentes, permitirá evaluar si una estrategia de selección asistida por marcadores es posible para el control de la tuberculosis bovina.

Estos objetivos se desarrollarán entre 2015 y 2017 gracias al recién concedido proyecto INIA-RTA2014-00002-Co2 titulado “Estrategias de control de la tuberculosis bovina en reservorios silvestres (tejón y jabalí) y domésticos (ovino)”.

## Resumen

Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB			
Campo	Resultado	Aplicación	Referencia
Diagnóstico	Únicamente un determinado tipo de lesiones de paratuberculosis (multifocales y difusas linfocíticas, poco frecuentes) podrían producir cierta interferencia con el diagnóstico de TB en bovino	Mejora la interpretación del diagnóstico de TB por intradermorreacción	Balseiro et al. 2003
Epidemiología	Tejón y jabalí presentan infección por TB en el norte de España y podrían dar lugar a la transmisión de la infección al bovino. Mapa de densidad de población de tejón en Asturias	Identificación de riesgos en bioseguridad ganadera	Balseiro et al. 2011a; 2011b; 2013; Muñoz-Mendoza et al. 2013; Acevedo et al. 2014a; Cowie et al. 2014b
Epidemiología	Identificación de la oveja como posible reservorio de TB	Identificación de riesgos en bioseguridad ganadera	Muñoz-Mendoza et al. 2012; 2015
Diagnóstico	Desarrollo de un ELISA específico de tejón	Identificación de animales infectados	Prieto et al. 2014b
Control	Identificación de genotipos bovinos asociados a resistencia/susceptibilidad a la TB	Selección genética de animales a favor de resistencia y en contra de susceptibilidad	

## 2. DESARROLLO DE VACUNAS Y HERRAMIENTAS DE DIAGNÓSTICO PARA EL CONTROL DE LA TUBERCULOSIS

---

*Centre de Recerca en Sanitat Animal (IRTA-CReSA)*

Contacto: Bernat Pérez de Val (bernat.perez@irta.cat)

### Historia

Desde su creación, en 1999, la tuberculosis animal forma parte de las áreas de investigación del *Centre de Recerca en Sanitat Animal* (CReSA). A partir de 2004, por encargo del *Departament d'Agricultura, Ramaderia, Pesca, Alimentació i Medi Natural* (DAAM) de la *Generalitat de Catalunya*, el CReSA está implicado en el **Programa de Erradicación** de la tuberculosis bovina en Cataluña, en tareas de diagnóstico, estudios epidemiológicos y asesoramiento a la administración. Desde el 1 de enero de 2015 el CReSA está integrado en el *Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries* (IRTA), albergando el programa de investigación en Sanidad Animal de esta entidad. En los últimos años, se trabaja en 2 líneas de investigación: a) **vacunas y diagnóstico** para el control de la tuberculosis animal y b) **epidemiología** de la tuberculosis bovina.

Desde el primer estudio de campo de eficacia de la vacuna viva BCG frente a la tuberculosis en caprinos, llevado a cabo en 2004, se ha investigado ininterrumpidamente en la seguridad, inmunogenicidad y eficacia de vacunas antituberculosas, así como en herramientas de diagnóstico asociadas a estrategias de vacunación. Para dichos propósitos, se han llevado a cabo desafíos experimentales en la **Unidad de Bioseguridad de Nivel 3** del CReSA con patógenos del complejo *Mycobacterium tuberculosis* en las especies bovina, caprina y porcina.

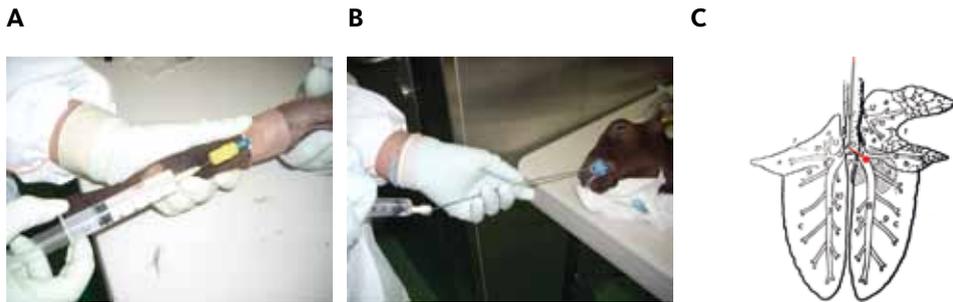
### Actualidad

La tuberculosis caprina supone un problema de sanidad animal y un riesgo para la salud pública tanto en Cataluña, como en diversas regiones de la Península Ibérica. La cabra puede actuar como **reservorio doméstico** de la tuberculosis (Napp et al. 2013), no obstante, la estrategia de erradicación basada en prueba y sacrificio de animales positivos no siempre ha resultado eficaz, sobre todo en rebaños de alta prevalencia, poniéndose de manifiesto la

necesidad de explorar medidas de control alternativas.

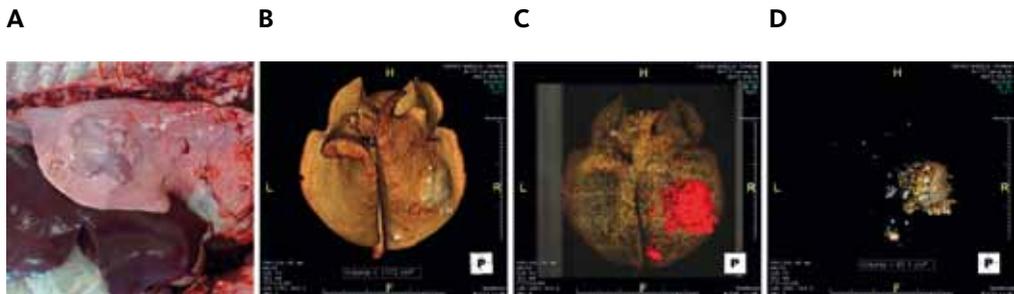
En este sentido, la línea de investigación de desarrollo de vacunas y herramientas de diagnóstico se ha centrado en el modelo caprino de tuberculosis. Así, recientemente se ha participado en 2 proyectos europeos del 7º Programa Marco y en un proyecto de investigación fundamental no orientada financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), llevando a cabo las siguientes tareas:

1. Desarrollo de un modelo de infección experimental con *Mycobacterium caprae* en cabras (Pérez de Val et al. 2011, Figura 1).



**Figura 1.** Infección experimental en cabritos. (A) Aplicación de la anestesia. (B) Inoculación endobronquial de *M. caprae* en posición de decúbito lateral derecho. (C) Representación esquemática de la de ruta de inoculación. (Fotos: CReSA)

2. Evaluación de la eficacia, inmunogenicidad y seguridad de diferentes candidatos a **vacuna contra la tuberculosis caprina** (Pérez de Val et al. 2012a; Pérez de Val et al. 2013; Vordermeier et al. 2014, Figura 2), así como la evaluación de nuevos reactivos de **diagnóstico para diferenciar animales infectados y vacunados (DIVA)**.



**Figura 2.** Evaluación de la eficacia vacunal por Tomografía Axial Computerizada (TAC). (A-D) Pulmones de una cabra no vacunada, 14 semanas después de la infección experimental. (A) Lesiones tuberculosas en fresco, localizadas en el lóbulo diafragmático derecho. (B) Reconstrucción volumétrica por TAC de todo el pulmón. El volumen pulmonar se muestra en el cuadro rojo. (C) El TAC permite diferenciar distintas densidades de tejido por el color: aire en negro, líquido (formol) de color gris y lesiones en rojo. (D) Representación volumétrica de las lesiones. El volumen total de las lesiones pulmonares se muestra en el cuadro rojo. (Fotos: CReSA)

3. Estudio de la **interferencia de la vacunación frente a paratuberculosis** en el diagnóstico de la tuberculosis caprina, evaluando también la protección cruzada (Pérez de Val et al. 2012b).

4. Primeros estudios a nivel de granja para evaluar la seguridad, inmunogenicidad y eficacia de la vacuna atenuada *M. bovis* BCG en caprinos a largo plazo.

## Futuro

A pesar de los avances recientes, todavía nos encontramos lejos de lograr una vacuna profiláctica esterilizante frente a la tuberculosis humana o animal. El objetivo principal en la actualidad es **disminuir la transmisión de la infección entre animales** (tanto domésticos como salvajes), ya sea por tratamiento preventivo o post-exposicional, que evite la progresión de la infección una vez esta se establece. La vacunación, junto con nuevas herramientas de diagnóstico asociadas, así como el uso de pro-bióticos, inmunomoduladores u otros tratamientos, pueden contribuir a alcanzar este objetivo y, por lo tanto, a **reducir la prevalencia de tuberculosis**. En el caso del ganado caprino, este factor resulta fundamental para poder realizar con éxito campañas de erradicación basadas en la estrategia de prueba y sacrificio de animales positivos. Los objetivos inmediatos de nuestro grupo de investigación se han enfocado en este sentido.

## Resumen

### Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB

Campo	Resultado	Aplicación	Referencia
Control	Desarrollo de un modelo de TB experimental en cabras que permite el seguimiento de la respuesta inmune y la evaluación cuantitativa de la patología y la carga bacteriana	Evaluación de nuevas vacunas, tratamientos o nutraceúticos. Evaluación de nuevas herramientas diagnósticas	Pérez de Val et al. 2011
Control	La BCG reduce la carga bacteriana pulmonar y la diseminación extrapulmonar en cabras desafiadas con <i>M. caprae</i>	Estudios de campo para evaluar la utilidad de la BCG para el control de la TB a nivel de granja	Pérez de Val et al. 2012a; 2013
Diagnóstico	Los reactivos DIVA evaluados permiten diferenciar animales vacunados contra TB o paratuberculosis de animales infectados, sin pérdida de sensibilidad	Mejora del diagnóstico de TB basado en tuberculinas en un escenario de vacunación	Pérez de Val et al. 2012a; 2012b



### **3. FAUNA SALVAJE Y TUBERCULOSIS EN CATALUÑA: CONOCIMIENTO ACTUAL Y PERSPECTIVAS**

---

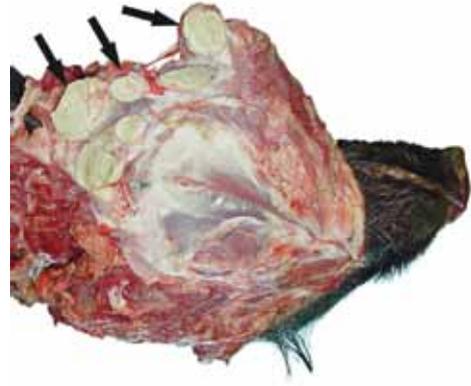
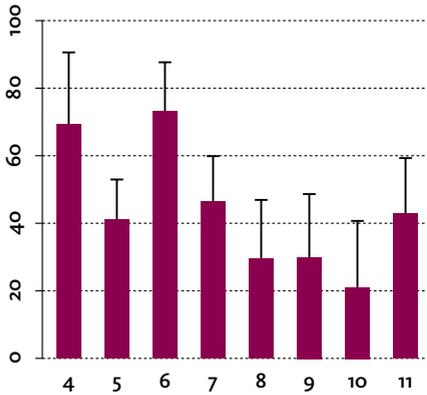
*Servicio de Ecopatología de Fauna Salvaje (SEFaS),  
Universidad Autónoma de Barcelona (UAB)*

Contacto: Santiago Lavín (santiago.lavin@uab.cat; sefas@uab.cat)

#### **Historia**

El Servicio de Ecopatología de Fauna Salvaje (SEFaS) inició su actividad en 1991, si bien se constituyó oficialmente en 1997 y es Grupo de Investigación Consolidado de la Generalitat de Cataluña desde 2005 (2014 SGR 1429). Somos un servicio de soporte a la gestión, la docencia y la investigación en el manejo y la sanidad de la fauna salvaje de la Universidad Autónoma de Barcelona. Nuestra actividad se basa en la firma de contratos y/o convenios con instituciones públicas, privadas y/o empresas. Se trata de un grupo multidisciplinar de profesionales con experiencia en la captura y manejo de animales salvajes, estudios anatomopatológicos, análisis de laboratorio y ecología de la enfermedad.

La tuberculosis es una enfermedad poco prevalente en las poblaciones de ungulados salvajes de Cataluña. El contexto epidemiológico difiere significativamente de lo que ocurre en el sur de la Península ibérica. No obstante, a finales de 2004 detectamos el primer foco de tuberculosis animal en fauna salvaje de Cataluña. Este hallazgo puso de manifiesto la importancia de la vigilancia sanitaria activa de la fauna, ya que la enfermedad había pasado desapercibida hasta la fecha a pesar de su elevada prevalencia local (Figura 1).



**Figura 1.** Lesiones crónicas de tuberculosis en los linfonodos cervicales de un jabalí adulto. Fue necesario que un veterinario examinara los jabalíes para detectar y/o que se diera importancia a estas lesiones. En el gráfico de barras se observa la evolución de la prevalencia de lesiones entre 2004 y 2011 (Mentaberre et al. 2014).

El estudio de este foco puso de manifiesto: (1) que los factores de riesgo necesarios para la aparición de un foco de elevada prevalencia también pueden darse en un contexto epidemiológico donde el riesgo se presupone bajo; (2) la conexión con ganado bovino infectado, que actuó como origen de la infección para el jabalí (Figura 2). Por este motivo se actuó a ambos niveles y fue necesario el vacío sanitario de la explotación afectada para conseguir eliminar la infección del rebaño. En el caso del jabalí, (3) la prevalencia de tuberculosis disminuyó tanto por efecto del vacío sanitario del ganado bovino como por el aumento sostenido de la extracción de jabalíes, que casi se triplicó (se pasó de 3.7 acciones de caza antes de detectar tuberculosis en el jabalí a 9.6 después). No obstante, no fue posible alcanzar la erradicación y la disminución de la abundancia de jabalíes y de la prevalencia de tuberculosis fueron transitorias (Mentaberre et al. 2014). Por último, también llamamos la atención sobre la aparente resistencia y falta de relevancia de la cabra montés en la epidemiología de la tuberculosis (Mentaberre et al. 2010), hecho que también ha sido señalado en otros estudios (García-Bocanegra et al. 2012). Este foco presentó otros rasgos diferenciales, como su delimitación espacial en ausencia de barreras artificiales o el bajo porcentaje de animales con lesiones generalizadas (11%) que se discuten en la publicación antes citada (Mentaberre et al. 2014). Esta investigación se desarrolló con el apoyo de dos proyectos INIA sobre enfermedades compartidas y en colaboración con VISAVET.

También participamos de un estudio serológico sobre tuberculosis realizado a nivel nacional con la colaboración de varios grupos (Boadella et al. 2011a).

### Actualidad

Mantenemos el seguimiento del foco en el sur de Cataluña. La prevalencia se mantiene o incluso aumenta en el jabalí a pesar de haber desaparecido la fuente inicial de contagio en el ganado, que se mantiene libre. Así pues el jabalí está siendo capaz de mantener la enfermedad por sí mismo en un espacio natural abierto, sin prácticas de manejo intensivo y con una densidad relativamente baja. En el futuro, cabe la posibilidad de que sea el jabalí el que actúe de fuente de contagio para el ganado u otras especies.



**Figura 2.** El ganado bovino, el jabalí y la cabra montés comparten hábitat en los Puertos de Tortosa y Beceite. Sin embargo, a día de hoy la tuberculosis sólo afecta al jabalí de la zona donde habitaba una ganadería de lidia con tuberculosis persistente. (Foto: SEFaS)

También participamos del plan de vigilancia sanitaria en fauna salvaje de Cataluña, en coordinación con el CReSA, principalmente como suministradores de muestras. Hasta la fecha se observa una seroprevalencia global baja en fauna salvaje, limitada a resultados positivos aislados en jabalí, principalmente, pero también en cabra montés y rebeco. En lo que se refiere a la vigilancia sanitaria pasiva, se han necropsiado 80 tejones sin que se haya detectado la enfermedad tras el cultivo bacteriológico. En consecuencia, esta especie no parece tener un papel relevante en la epidemiología de la tuberculosis en Cataluña.

Por otro lado, colaboramos con el grupo de la Universidad de Extremadura (UNEX) liderado por el Dr. Javier Hermoso en el estudio del papel de las coinfecciones y la dieta en el desarrollo y la epidemiología de la tuberculosis en el jabalí.

## Futuro

La caza es la herramienta de gestión más utilizada para gestionar los conflictos derivados de la sobreabundancia de jabalíes, entre otras cosas por su bajo coste. Sin embargo, antes hemos visto cómo el aumento de la extracción de jabalíes, realizada mediante la caza y la captura con cajas trampa, tuvo un efecto pasajero sobre la abundancia de esta especie. Esto pone de manifiesto la capacidad del jabalí para soportar y compensar tasas de extracción elevadas. Por lo tanto, la gestión de sus poblaciones debe evolucionar más allá del simple aumento de la caza. Estamos investigando nuevas estrategias con este fin. Respecto a la cabra montés, sería interesante evaluar si cabras afectadas de linfadenitis caseosa, enfermedad prevalente en la población del sur de Cataluña, pueden dar positivo a la prueba ELISA para la detección de tuberculosis. Este estudio se realizaría en colaboración con el CReSA.

En relación a la vigilancia sanitaria, no se conocen otros focos de elevada prevalencia de tuberculosis en fauna salvaje de Cataluña. Sin embargo, se mantienen o continúan apareciendo focos en el ganado doméstico, algunos de los cuales se vinculan al contagio desde fauna salvaje por descarte de las otras posibles vías de entrada. Nos gustaría animar a las autoridades competentes a llevar a la práctica los preceptos de la sanidad única. De otra forma no será posible realizar una vigilancia sanitaria de la fauna salvaje adecuada, eficaz y transferible a la mejora de la sanidad animal. En este sentido, es imprescindible investigar la presencia y epidemiología de la tuberculosis en la interfase doméstico-salvaje en toda Cataluña. Esto no es posible en la actualidad debido a la falta de financiación.

## Resumen

Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB			
Campo	Resultado	Aplicación	Referencia
Detección	Detección de un foco de TB con alta prevalencia en jabalí en un área geográfica con pocos factores de riesgo	Mejorar la vigilancia sanitaria activa y la prevención del riesgo en contextos locales	Mentaberre et al. 2014
Epidemiología / Diagnóstico molecular	Conexión epidemiológica entre el ganado vacuno y el jabalí	Reducir el riesgo en zonas de interacción	
Control	Eficacia transitoria del sacrificio de jabalíes. El control es mucho más sencillo en el compartimento doméstico	Prevención y diseño de estrategias combinadas	
Epidemiología	Ausencia de la enfermedad en cabra montés	Estudiar los factores de aparente resistencia	Mentaberre et al. 2010

## 4. ESTUDIOS SOBRE LA EPIDEMIOLOGÍA DE LA TUBERCULOSIS BOVINA EN ESPAÑA

---

**IRTA-CReSA / UAB**

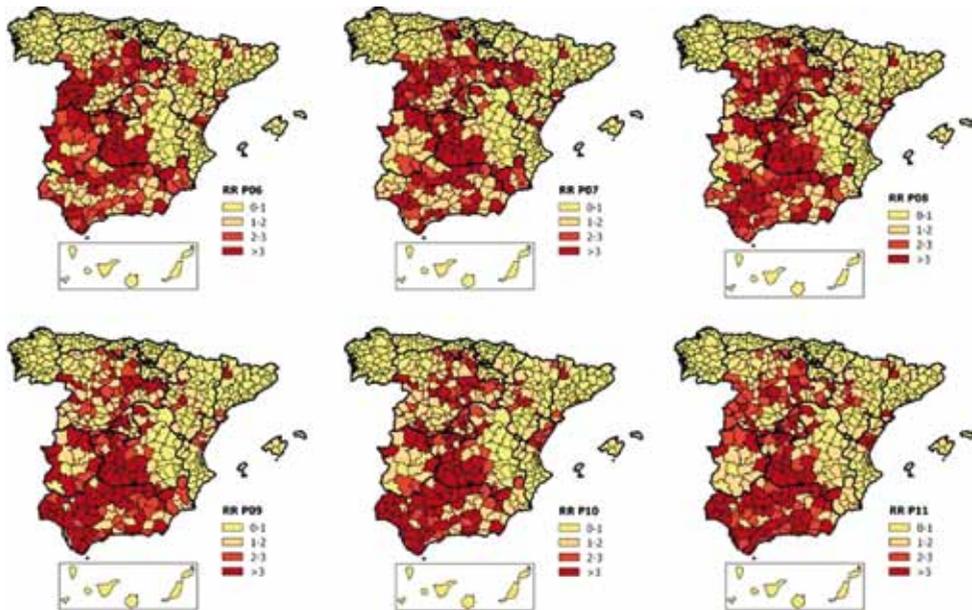
Contacto: Alberto Allepuz (alberto.allepuz@uab.cat)

### **Historia**

En los últimos años el grupo de epidemiología del *Centre de Recerca en Sanitat Animal* (CReSA) ha desarrollado dos proyectos de investigación financiados por el MINECO con el objetivo de profundizar en el conocimiento de la epidemiología de la enfermedad en animales domésticos.

### **Actualidad**

En el primer proyecto se desarrolló un modelo espacio-temporal para evaluar el programa de erradicación y su relación con diferentes variables. Se observó que el riesgo de tuberculosis bovina era más del triple en la zona centro y sur de España en comparación al resto del país (Figura 1), y que la evolución temporal a nivel comarcal es variable. Se determinó que la presencia de lidia y el número de movimientos de alto riesgo (desde comarcas con incidencia superior al 1%) incrementaban significativamente el riesgo de tener rebaños infectados por tuberculosis en la comarca.



**Figura 1.** Variabilidad geográfica del riesgo relativo de infección a nivel de comarca entre los años 2006 y 2011. El riesgo de tuberculosis es más del triple en la zona centro y sur en comparación al resto del país.

Paralelamente, se analizó el origen más probable de la infección en 687 explotaciones reportadas como nuevas positivas en diferentes Comunidades Autónomas. Para ello, se elaboró una metodología de trabajo basada en árboles de decisión que se nutría de la información recogida en las encuestas epidemiológicas y que se graban en un sistema informático llamado BRUTUB, desarrollado por el MAGRAMA. En un porcentaje importante de las granjas estudiadas se identificó la recirculación de una infección anterior como la causa más probable. Los principales resultados se presentan en la siguiente tabla.

**Tabla 1.** Causas más probables de las nuevas granjas positivas estudiadas.

Causas	Zona Norte y Este	%	Zona Centro y Sur	%
Infección residual	24	17,3	129,5	23,6
Entrada de animales	8	5,8	27	4,9
Interacción con cabras	2,5	1,8	14,5	2,6
Vecindad	2	1,4	53	9,7
Pastos	13,5	9,7	35	6,4
Interacción con fauna silvestre	11	7,9	79	14,4
Contacto con personas infectadas	2	1,4	0	0,0
Desconocida	76	54,7	210	38,3
<b>Total</b>	<b>139</b>		<b>548</b>	

En un tercer trabajo se estudiaron factores asociados con la persistencia de tuberculosis. Para ello se compararon granjas que se habían mantenido como positivas durante al menos 5 años (casos) con granjas que habían eliminado la infección rápidamente (controles). Se observó que aquellas explotaciones con mayores áreas de pastoreo o con granjas vecinas positivas tenían mayor probabilidad de sufrir un brote persistente en el tiempo. Finalmente, en otro trabajo se analizó la sensibilidad de la inspección *post-mortem* en matadero, observándose que una baja proporción de animales infectados (alrededor del 30-40%) presentan lesiones visibles y en consecuencia, aún realizando una inspección minuciosa, la sensibilidad es baja (alrededor del 50%). Por otro lado se realizó un estudio de brote en el que se identificó una granja caprina vecina como el origen de un brote en una granja bovina.

## **Futuro**

El objetivo es continuar profundizando en el conocimiento de la epidemiología de la tuberculosis bovina en España.

### *Objetivos específicos:*

1. **Desarrollo de un sistema de vigilancia basada en riesgo a nivel de granja:** Para ello, se evaluará la asociación de diferentes factores con la probabilidad de infección de las granjas. Esta probabilidad de infección se combinará con la probabilidad de detección para determinar, para cada tipo de granja, el sistema de vigilancia más eficaz.
2. **Estudio de los factores asociados con la recurrencia y la persistencia de la tuberculosis:** La persistencia y la recurrencia son las mayores dificultades para la erradicación, de ahí la relevancia de evaluar sus causas.
3. **Estudio de la influencia de aspectos sociológicos en el programa de control:** También se pretende explorar desde un punto de vista sociológico la percepción y actitud de ganaderos y veterinarios en relación al control de la enfermedad, y su posible influencia sobre la eficacia del mismo.
4. **Eficacia y rentabilidad de diferentes estrategias para la eliminación de la tuberculosis de las granjas infectadas:** Evaluar qué estrategia de control sería más eficaz, tanto desde el punto de vista del tiempo necesario, como de su coste económico para la eliminación de la tuberculosis de las granjas infectadas.
5. **Papel epidemiológico de los potenciales reservorios domésticos en España:** Se realizarán estudios para conocer la prevalencia y dispersión de la tuberculosis en ganado caprino, ovino y porcino extensivo en zonas de alta y baja prevalencia en España.

Estos estudios se llevan a cabo en colaboración con la Universidad de Córdoba.

## Resumen

Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB			
Campo	Resultado	Aplicación	Referencia
Epidemiología	La evolución del programa a nivel de comarca es heterogéneo y está relacionado con los movimientos de animales y la presencia de lidia en la comarca	Revisar la aplicación de los programas de control en determinadas comarcas y la ejecución de las pruebas pre-movimiento. Reforzar el programa sobre el ganado de lidia	Allepuz et al. 2011; García-Saenz et al. 2014
	Un elevado porcentaje de las nuevas granjas positivas de cada año son en realidad recirculaciones de infecciones anteriores	Importancia de maximizar la sensibilidad diagnóstica al calificar rebaños como T <sub>3</sub>	Guta et al. 2014a
	Las granjas con mayores áreas de pastoreo y granjas vecinas infectadas tienen mayor probabilidad de sufrir un brote persistente	Posibilidad de establecer medidas en este tipo de granjas para minimizar la probabilidad de tener brotes persistentes	Guta et al. 2014b
	La sensibilidad de la vigilancia a nivel de matadero es baja (por debajo del 50%)	La vigilancia a nivel de matadero es esencial, pero debe ser complementada con otros métodos para la detección de casos de TB	Saenz et al. (en revisión)
	El contacto (directo o indirecto) con ganado caprino supone un riesgo para la infección de granjas bovinas	Es necesario considerar al ganado caprino como una de las posibles fuentes de infección del bovino	Napp et al. 2013

## 5. ENSAYOS MULTIESPECIE PARA LA DETECCIÓN SEROLÓGICA DE *M. BOVIS*

---

*Inmunología y Genética Aplicada S.A. (INGENASA). Madrid. [www.ingenasa.com](http://www.ingenasa.com)*

Contacto: Paloma Rueda ([prueda@ingenasa.com](mailto:prueda@ingenasa.com), [aventeo@ingenasa.com](mailto:aventeo@ingenasa.com))

### **Historia**

INGENASA es la empresa biotecnológica más veterana de España. Se creó en el año 1981 con el objetivo de investigar y desarrollar herramientas para ayudar a prevenir y controlar enfermedades infecciosas de relevancia en el sector de la salud animal, siendo hoy en día todo un referente en el diagnóstico de sanidad animal. Desde finales de los años 80, INGENASA ha tenido un gran interés en la internacionalización, con el objetivo de aumentar su eficiencia y competitividad, y de aprender nuevas tecnologías y procesos. En la actualidad sus productos se distribuyen en 80 países. Además, INGENASA fue la primera empresa española que participó en un proyecto europeo en el año 1986. Desde entonces, ha sido partícipe de numerosos proyectos dentro de los Programas Marco de Investigación desarrollados por la Unión Europea, o parcialmente financiados por instituciones públicas nacionales. Fruto de esta investigación, INGENASA dispone de las tecnologías de preparación de anticuerpos monoclonales, clonaje de genes, expresión de proteínas recombinantes en bacterias y en células de insecto, PCR, transcriptómica y microarrays, que le permiten la puesta a punto de ensayos de diagnóstico serológicos (ELISAs, Inmunocromatografías y Arrays) y moleculares (PCR convencional y de tiempo real). Cuenta además con más de 90 publicaciones en revistas especializadas de ámbito internacional, 16 familias de patentes y un amplio catálogo de productos con más de 100 referencias.

El primer acercamiento de INGENASA a la tuberculosis bovina comenzó en 1997 con la promoción de un ensayo de detección del gamma interferón. La mayor parte de las herramientas diagnósticas disponibles para la detección de la tuberculosis bovina, se basan en ensayos relacionados con la respuesta inmune celular del animal, sin embargo, el análisis de la producción de anticuerpos frente a *M. bovis* puede constituir una alternativa de gran utilidad para el análisis de rebaños y animales salvajes. Por ello, y dada la experiencia de INGENASA en el desarrollo de ensayos serológicos, se comenzó a trabajar en esta dirección. La participación en el proyecto europeo "Strategies for the eradication of bovine tuberculosis:

TB-STEP” (FP7-KBBE. 2009-2011), permitió establecer una estrecha colaboración con grupos de investigación nacionales e internacionales de relevancia en el sector, y fue el punto de partida para la puesta a punto de nuevos diagnósticos.

Aunque económicamente el principal sector afectado por *M. bovis* es el de la ganadería bovina, también puede afectar a muchas otras especies animales. Además, dado el gran interés de la comunidad científica y de las autoridades sanitarias en llevar a cabo estudios epidemiológicos en fauna silvestre y de zoo, que permitan establecer medidas que ayuden a controlar la dispersión de la enfermedad, se han diseñado ensayos serológicos que pueden ser utilizados en múltiples especies. Por un lado, se han puesto a punto ensayos de tipo ELISA que permiten al análisis masivo de muestras en el laboratorio y, por otro, un ensayo rápido, económico y fácil de usar, basado en la técnica de la cromatografía, que permite una detección de anticuerpos específicos de *M. bovis* en el campo.

En la actualidad, INGENASA participa en el proyecto europeo “Integrated solutions for Tuberculosis control in animals combining vaccination and multi-species diagnostics: WildTBVac” (FP7-KBBE. 2013-2015), que permitirá llevar a cabo la validación de los ensayos serológicos desarrollados en los últimos años, necesaria para su futura utilización en los laboratorios y en el campo.

## Actualidad

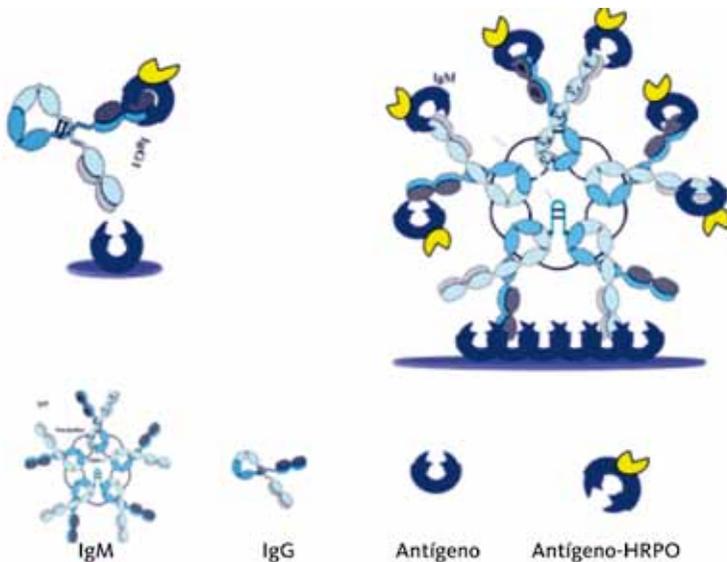
### ENSAYO DE DOBLE RECONOCIMIENTO (DR) MULTIESPECIE

Durante muchos años, el esfuerzo en el seguimiento y control de la tuberculosis se ha centrado prácticamente en exclusiva en el ganado bovino. Sin embargo, durante los últimos años se ha tomado conciencia de la enorme importancia que tienen las infecciones provocadas por *M. bovis* en otras especies, tanto silvestres como domésticas. El gran reto entonces ha sido disponer de un diagnóstico capaz de detectar cualquier tipo de animal infectado, independientemente de la especie a la que pertenezca. Para ello, INGENASA, comenzó en 2011 el desarrollo de un inmunoensayo denominado de Doble Reconocimiento o ELISA DR. La geometría de este ensayo se basa en que los anticuerpos positivos presentes en el suero, deben reconocer dos veces al antígeno. Este antígeno, la proteína de *M. bovis* denominada MPB83, se produce de manera recombinante en *E. coli* o en células de insecto y el anticuerpo la ha de reconocer simultáneamente tanto fijada a un pocillo de ELISA, como conjugada al enzima peroxidasa, la cual será finalmente la responsable de desarrollar el color que nos dice que el individuo es positivo (Figura 1). Este ensayo, tiene como característica principal, que permite trabajar con sueros de cualquier animal, ya sea mamífero o ave. Además tiene la propiedad de ser independiente de la clase de anticuerpo que se una y de ser especialmente sensible en la detección de IgMs, lo que le confiere una elevada capacidad para la detección de infecciones tempranas o recientes. En la siguiente tabla se muestran los resultados de sensibilidad y especificidad del ELISA-DR, obtenidos con animales de distintas especies tanto de campo como procedentes de distintos ensayos experimentales.

**Tabla 1.** Detección de anticuerpos frente a *M. bovis* en distintas especies. En azul y en rojo se indica el número de muestras analizadas, negativas y positivas respectivamente.

Especie	n	Especificidad	Sensibilidad
Tejones	25	100%	97,20%
	36		
Ciervos	82	97,6%	50%
	56		
Jabalí campo	126	99,2%	80,5%
	118		
Jabalí exp	65	100%	97,6%
	42		
Vacas exp	42	100%	93%
	29		
Alpacas	317	97,4%	70,5%
	134		

También se han probado más de un centenar de sueros de animales exóticos procedentes de distintos zoos (desde focas hasta aves, pasando por primates, elefantes, watussis, etc) detectándose hasta un 8% de animales positivos. Sin embargo, hasta el momento, los resultados obtenidos con vacas de campo no han sido tan satisfactorios, probablemente debido a su complicada serología como consecuencia de las múltiples tuberculinizaciones que sufren a lo largo de su vida. Este ensayo se encuentra en proceso de adaptación para su próxima comercialización.



**Figura 1.** Esquema del ELISA-DR para la detección de anticuerpos frente a *M. bovis* basado en la proteína MPB83 recombinante.

## ENSAYO INDIRECTO PORCINO

El ganado porcino, sin embargo, merece un trato especial. Esta especie, tanto el cerdo criado en intensivo como en extensivo, así como el jabalí, suelen presentar una potentísima respuesta inmunológica frente a una infección por *M. bovis*. Por estos motivos, INGENASA ha desarrollado un ensayo exclusivo para el ganado porcino. Este ensayo ha demostrado una elevada sensibilidad (90%) y especificidad (99,2%) con los sueros de jabalí y de cerdo analizados hasta el momento. Este ensayo, al igual que el anterior, está próximo a su comercialización.

## Futuro

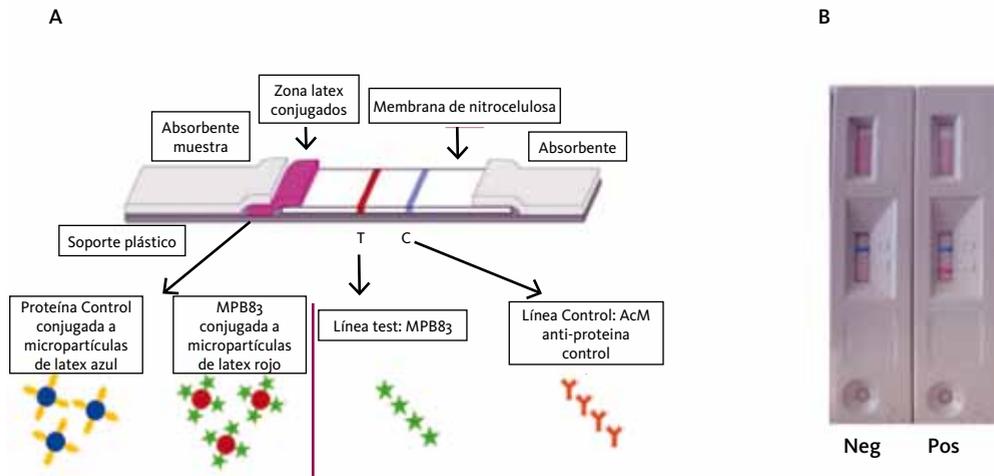
Siempre dentro del marco del diagnóstico de la tuberculosis animal, el objetivo de INGENASA es desarrollar ensayos complementarios a los descritos y utilizados hasta ahora, que ayuden al diagnóstico rápido y al seguimiento de la enfermedad. Esto es especialmente importante en fauna silvestre, en donde estos objetivos son más difíciles de conseguir que en explotaciones de ganado intensivo.

### 1. Desarrollo de un ELISA de captura para la detección de IgG e IgM específica de tuberculosis en ganado porcino

La posibilidad de detectar IgMs e IgGs de manera individual producidas en respuesta a una infección, es de vital importancia para poder conocer la cronología de la misma. Cuando se produce una infección, ya sea vírica o bacteriana, los primeros anticuerpos que se producen son de clase IgM y a los pocos días comienzan a aparecer los de clase IgG. Sin embargo, las IgMs perduran sólo un corto periodo de tiempo mientras las IgGs se mantienen durante años. Así, la presencia o no de IgMs es indicativo de una infección reciente. En infecciones experimentales con *M. bovis* en cerdo o jabalí, resultados preliminares han demostrado que las IgMs apenas son detectables pasados dos meses de la infección. Por tanto, el detectar IgMs específicas de *M. bovis* en un individuo indica que la infección se ha producido recientemente, en no más de 2 meses atrás. Este dato, combinado con otros tipos de estudios epidemiológicos, de movimientos de animales, áreas de concurrencia, etc, puede ser de inestimable ayuda para conocer cuándo, dónde, cómo y porqué se producen las infecciones y así poder actuar en consecuencia.

### 2. Desarrollo de ensayos inmunocromatográficos para la detección de tuberculosis multiespecie

Los ensayos inmunocromatográficos, denominados también ensayos de campo (field tests), on-site, pen-side y point of care tests, tienen las ventajas de ser rápidos, sensibles y que no necesitan de equipos de laboratorio ni de personal altamente cualificado. Estos dispositivos se pueden utilizar en la propia granja y en el campo y sólo necesitan de una gota de sangre. Esto puede resultar de interés para confirmar animales infectados y poder proceder como sea conveniente sin tener que esperar a la confirmación laboratorial. Este tipo de ensayos son la versión inmunocromatográfica de los ensayos ELISA DR multiespecie (Figura 2).



**Figura 2.** (A) Esquema de las distintas partes de una tira de Inmunocromatografía para la detección de anticuerpos frente a *M. bovis*. (B) Resultado del ensayo con un suero positivo y negativo.

### 3. Llevar a mercado los resultados desarrollados hasta la fecha

INGENASA pretende poner en el mercado en el menor tiempo posible tanto el ELISA DR y las tiras de cromatografía multispecie, así como el ELISA indirecto para ganado porcino.

Se seguirá trabajando en proyectos de investigación y colaborando con los Centros Públicos y empresas del sector.

## Resumen

Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB		
Campo	Resultado	Aplicación
Diagnóstico	ELISA de doble reconocimiento, para la detección de TB multiespecie	<p>Detección de animales infectados de TB independientemente de la especie que se trate. Especialmente útil para fauna silvestre</p>
Diagnóstico	ELISA indirecto para la detección de TB en jabalí y cerdo	<p>Detección de animales infectados para la eliminación selectiva en jabalí y cerdo ibérico criado en sistema extensivo</p> <p>Confirmación de granjas libres de TB para permisos de movimientos de animales a determinadas zonas</p> <p>Diferenciación de animales vacunados e infectados</p>

## 6. LA TUBERCULOSIS ANIMAL: UNA INFECCIÓN MULTI-HOSPEDADOR

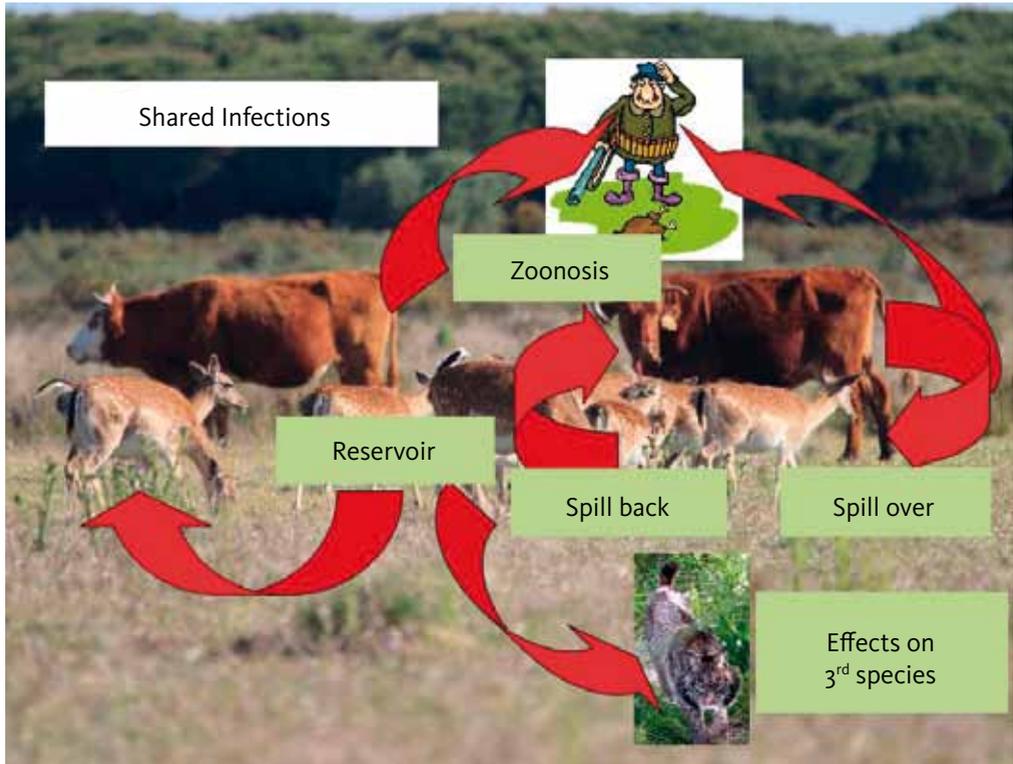
---

*Grupo de investigación en Sanidad y Biotecnología (SaBio) del Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos IREC (Universidad de Castilla – La Mancha @ CSIC)*

Contacto: Christian Gortázar (christian.gortazar@uclm.es; web: www.SaBio-IREC.com)

### **Historia**

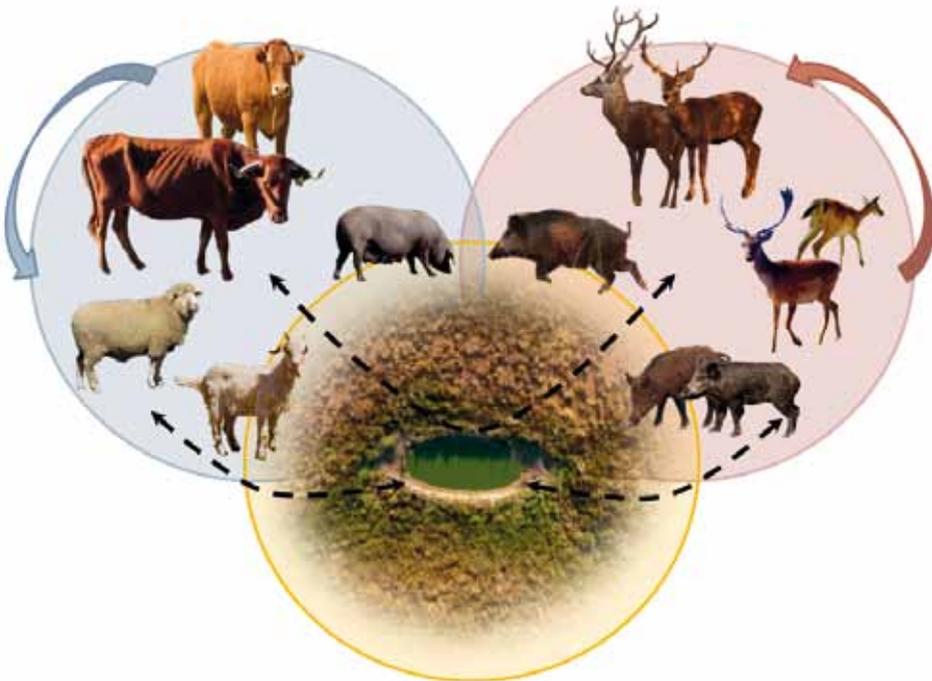
El IREC, primer centro de investigación español en la encrucijada entre ecología, producción y sanidad animal, se creó en 1999. Los investigadores del Área de Sanidad Animal vienen trabajando en tuberculosis desde el comienzo, tras encontrar lesiones tuberculosas en –literalmente– el primer jabalí necropsiado. Ello motivó la propuesta de un primer proyecto nacional sobre enfermedades compartidas con el jabalí (AGL2001-3947). Los trabajos desarrollados permitieron describir las lesiones en ungulados silvestres (Gortázar et al. 2003; Martín-Hernando et al. 2007; 2010), esbozar la prevalencia y distribución geográfica del problema y los factores de riesgo asociados (Vicente et al. 2006; 2007a), y comenzar a establecer relaciones entre hospedadores silvestres, domésticos y personas mediante epidemiología molecular (Gortázar et al. 2005). En un plano más general, se identificaron los riesgos sanitarios asociados a la “sobreadundancia” de fauna silvestre (Gortázar et al. 2006), y se acuñó el concepto de “enfermedades compartidas” o “infecciones compartidas con la fauna silvestre” (Gortázar et al. 2007).



**Figura 1.** Concepto de infección compartida (shared infections) con la fauna silvestre. Estas infecciones, como la causada por el complejo *M. tuberculosis*, suelen tener su origen en el ganado. Cuando saltan a la fauna silvestre, ésta puede llegar a mantenerlas de forma independiente, convirtiéndose en reservorio (reservoir). El problema de los reservorios es que mantienen infecciones con posibles consecuencias adversas para el hombre (zoonosis), para el ganado y para la propia fauna silvestre.

Esta línea continuó con el proyecto nacional “Epidemiología de las enfermedades compartidas entre ungulados silvestres y ganado en España: aproximación multidisciplinar, AGL2005-07401” y la coordinación de la Red temática sobre Investigación de Enfermedades Compartidas con fauna silvestre RIEC, apoyada por la Acción Movilizadora INIA “interacción sanitaria entre fauna silvestre y ganadería extensiva”. Además se logró internacionalización mediante el proyecto europeo “TB-STEP Strategies for the eradication of bovine tuberculosis (FP7KBBE; Grant 212414, 2009-2011)”. Durante esta etapa también se estrechó la colaboración con las autoridades españolas de sanidad animal, en el Ministerio de Agricultura. Las nuevas investigaciones sobre tuberculosis ampliaron el campo de acción del grupo desde la epidemiología hacia terrenos afines como diagnóstico, genética y biología molecular, o control sanitario. También se ha evolucionado hacia la integración de la ecología de la tuberculosis en modelos multihospedador, lo que ha resultado fundamental no solo para ampliar los conocimientos fundamentales, sino para desarrollar medidas de gestión en la fauna silvestre y la ganadería (proyecto nacional “Factores de riesgo y epidemiología espacio-temporal de la tuberculosis en bovino extensivo: un modelo para el control de la enfermedad”; AGL2010-20730). Éstos son algunos de los hitos destacables en esa etapa:

- Reconocimiento del jabalí como reservorio de tuberculosis (Naranjo et al. 2008b).
- Avances en la comprensión del papel de los diferentes actores, silvestres y domésticos, en el mantenimiento del complejo *M. tuberculosis* (Gortázar et al. 2008; 2011a; 2011b).
- Las altas densidades poblacionales y la agregación de ungulados silvestres (jabalí, ciervo, gamo) en torno a puntos de agua y afines se correlacionan con mayores prevalencias de tuberculosis (Acevedo et al. 2007; Vicente et al. 2007a; 2007b; Gortázar et al. 2008).
- Existen diferencias en la expresión génica entre jabalíes tuberculosos y no tuberculosos. Algunos genes tienen relación con la resistencia a *M. bovis* observada en jabalíes expuestos pero sanos (Acevedo-Whitehouse et al. 2005; Naranjo et al. 2006; 2008a).
- Primeros casos de tuberculosis en tejón en España (Sobrino et al. 2008).
- Relevancia de las relaciones intra e interespecíficas en comunidades complejas de hospedadores domésticos y silvestres (Gortázar et al. 2008; 2011a).
- Implementación y verificación por primera vez de medidas de bioseguridad, basadas en el conocimiento del comportamiento animal y la epidemiología ambiental de la tuberculosis, que se mostraron eficaces (Barasona et al. 2013b).



**Figura 2.** Representación esquemática de la comunidad de ungulados hospedadores del complejo *M. tuberculosis* en ambientes mediterráneos. Los puntos de agua constituyen la forma de contacto entre especies más significativa en este tipo de ambientes. La estabilidad del sistema será tanto mayor cuantas más especies hospedadoras formen parte del mismo. Fuente: José Ángel Barasona.

## Actualidad

En 2014 arrancó un proyecto nacional, que continúa el estudio de las interacciones entre ungulados silvestres y ganado, y la mejora de la bioseguridad (Desarrollo de protocolos de mitigación del riesgo de contacto y transmisión de enfermedades compartidas entre ganado y ungulados silvestres - AGL2013-48523). Además, el grupo SaBio aumentó su internacionalización a través de la coordinación del proyecto EU FP7 EMIDA (ERA-NET) APHAEA sobre monitorización poblacional y sanitaria de la fauna silvestre en Europa, y de la participación en el proyecto FP7 ANTIGONE sobre zoonosis emergentes. En esta etapa pueden distinguirse varias líneas de actividad en investigación sobre tuberculosis: (1) epidemiología, (2) control sanitario, e (3) interacción patógeno-hospedador.

**Epidemiología:** Tres aspectos novedosos respecto al periodo anterior son la perspectiva cada vez más internacional del problema (Gortázar et al. 2012; Medrano et al. 2012; Acevedo et al. 2013); la exploración de patrones temporales en tuberculosis animal (Boadella et al. 2011b; Vicente et al. 2013); y la inclusión, cada vez en mayor medida, de los actores domésticos en los estudios epidemiológicos. En cuanto a estudios a largo plazo, se describen los determinantes de tuberculosis en poblaciones de ungulados silvestres: factores estocásticos (ej. precipitaciones), densodependientes (ej. abundancias) y de gestión (ej. vallados). Estos resultados se obtienen mediante la acumulación y monitorización de información desde 1999 (Vicente et al. 2013).

Los estudios de campo pasan del registro de prevalencias en fauna silvestre al estudio detallado de las interacciones entre fauna silvestre (principalmente ciervo y jabalí) y ganado doméstico bovino, ovino-caprino y porcino extensivo (Rodríguez-Prieto et al. 2012; Kukielka et al. 2013; Barasona et al. 2014a; 2014b). Este aspecto se expone de forma más detallada en el capítulo 7 de este libro.

**Control sanitario:** Este campo abarca todas las opciones de intervención (incluida su ausencia), es decir la mejora de la bioseguridad de las explotaciones, el control poblacional selectivo o no, y la vacunación (Beltrán-Beck et al. 2012). Este último aspecto se encuentra desarrollado en el capítulo 8 de este libro. En cuanto al campo de la bioseguridad, se están desarrollando programas de bioseguridad específicos frente a la fauna silvestre válidos en la zona centro y sur del país, que esta vez, se aplicarán individualmente en cada explotación extensiva de riesgo. Es relevante mencionar la incorporación de la sociología para la implementación óptima de acciones de control sanitario que sean eficaces, pero a la vez aceptadas por los principales actores participantes (autoridades sanitarias, veterinarios, ganaderos, gestores de la fauna y colectivo de la caza) (Cowie et al. 2014a; 2014b; 2015). Finalmente, se han desarrollado sendas experiencias de control poblacional de jabalí. La primera, con control no selectivo, demostró semi-experimentalmente que una reducción significativa del número de jabalíes redundaba en una menor prevalencia de tuberculosis en el jabalí, pero también en una menor incidencia de tuberculosis en ciervos y bovinos simpátricos (Boadella et al. 2012b). La segunda experiencia, desarrollada en colaboración con empresas a través del Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (CDTI), comprobó que la eliminación selectiva de jabalíes tuberculosos no resulta efectiva para el control sanitario.

**Interacción patógeno-hospedador:** El estudio de jabalíes infectados de forma natural, así como los experimentos de laboratorio sobre vacunas, ha venido generando material para análisis genómicos y ha dado lugar al planteamiento de nuevas preguntas, particularmente sobre los mecanismos de respuesta y protección en el jabalí (de la Fuente et al. 2011; Beltrán-Beck et al. 2014b).



**Figura 3.** Ciervo caquéctico y con varios linfonodos muy engrosados, fotografiado en un espacio natural durante la berrea. El recuadro presenta las lesiones tuberculosas en linfonodos mesentéricos del mismo individuo. (Fotos: Andrés Ríos)

## Futuro

El objetivo general de SaBio es contribuir a la salud, la producción animal y la conservación a través de investigación y desarrollo tecnológico. La tuberculosis, como zoonosis con gran impacto en la producción ganadera extensiva e incluso en la conservación de especies amenazadas como el lince ibérico (*Lynx pardinus*), constituye una de las principales líneas de investigación en SaBio. En los próximos años, los investigadores del grupo dedicarán una parte importante de su tiempo a avanzar en el control de la tuberculosis animal. Para ello se desarrollarán los siguientes objetivos:

### 1. Conocer en profundidad los mecanismos que posibilitan el mantenimiento de la infección en sistemas multi-hospedador.

Aún hay muchos aspectos de la relación patógeno-hospedador-medio que no conocemos en suficiente detalle. ¿Cuál es el peso relativo de cada especie hospedadora y del medio, en diferentes situaciones? Para responder a esta pregunta se están aplicando técnicas tradicionales en combinación con otras muy novedosas, y se están encontrando resultados inesperados, por ejemplo relacionando la tuberculosis con la mortalidad de jabalíes, o relacionando la selección genética del ciervo con la tuberculosis. En el ámbito de las especies de producción, el papel de los reservorios no-bovinos va adquiriendo cada vez mayor relevancia. Para este objetivo es fundamental desarrollar herramientas de otras disciplinas, como la dinámica poblacional.

## **2. Explorar nuevas estrategias, posiblemente integradas, de control de la tuberculosis animal en sistemas multi-hospedador.**

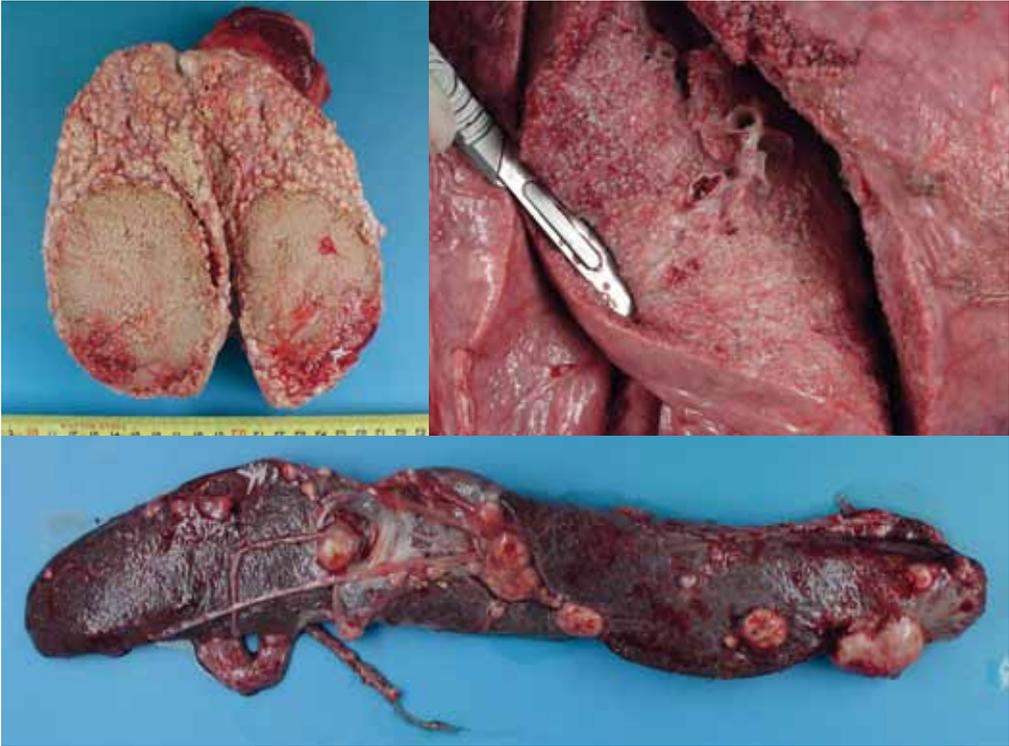
El reciente desarrollo de medidas de mejora de la bioseguridad abre una excelente oportunidad para el trabajo con el sector ganadero. En paralelo, los resultados obtenidos en el desarrollo de vacunas y otras medidas de control en reservorios silvestres facilitan la intervención sobre este compartimento en colaboración con el sector cinegético. Se trata de responder a las siguientes preguntas: ¿Cómo podemos actuar mejor sobre el medio y sobre los hospedadores a fin de limitar el mantenimiento de la infección? ¿Cuál es el efecto, en términos de menor incidencia de tuberculosis en especies ganaderas, de estas actuaciones – dónde están los límites? Abordar este objetivo será de gran utilidad para el control de otras enfermedades que coinciden en sus principales factores de riesgo y que se benefician de la interacción en las zonas de contacto entre fauna y ganado.

## **3. Avanzar en el entendimiento de la interacción entre los miembros del complejo *M. tuberculosis* y sus hospedadores.**

¿Existen genotipos más o menos transmisibles y más o menos virulentos? ¿Cuál es el papel de la exposición a micobacterias ambientales y de las co-infecciones en la patogenia de la tuberculosis? ¿Qué mecanismo explica la protección frente a tuberculosis conferida por la administración de micobacterias inactivadas? ¿Cómo podemos aprovechar los mecanismos genéticos de resistencia para el control de la tuberculosis (Acevedo-Whitehouse et al. 2005; Queirós et al. 2014)? ¿Qué nuevas aportaciones podemos esperar de las nuevas herramientas “ómicas” y de secuenciación masiva?

## **4. Llevar a mercado los resultados desarrollados hasta la fecha.**

Para ello, con el apoyo de la Universidad de Castilla-La Mancha, se ha puesto en marcha la spin-off del grupo SaBio, SABIOTec (sabiotec@sabiotec.es). Para continuar en este camino se trabajará en colaboración con otras empresas de los sectores veterinario, farmacéutico y ganadero.



**Figura 4.** Tuberculosis generalizada en un jabalí. En la esquina superior izquierda se aprecia una orquitis tuberculosa, un hallazgo excepcional. Las lesiones granulomatosas en bazo y la tuberculosis generalizada en pulmón sugieren una difusión hematogena. Las espectaculares lesiones pulmonares, donde prácticamente no queda parénquima sano, sugieren que este animal excretaba micobacterias de forma masiva. Se trata de un macho adulto que, de haber sobrevivido hasta la temporada cinegética, hubiese resultado valioso para su propietario. (Fotos: Álvaro Mata, SABIOTec)

## Resumen

Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB			
Campo	Resultado	Aplicación	Referencias
Diagnóstico	Puesta a punto y mejora de pruebas diagnósticas (ELISA e IDTB) en jabalí y en cérvidos	Diagnóstico y protocolos de testado y eliminación selectiva en jabalí y en cérvidos	Fernández-de-Mera et al. 2009; Jaroso et al. 2010a; 2010b; Boadella et al. 2011b; 2012a
Epidemiología	Identificación de los reservorios silvestres más importantes para el mantenimiento de la TB en Iberia	En sistemas multi-hospedador difícilmente se logrará la erradicación sin contemplar a todos los actores involucrados – jabalí, ciervo y gamo en los ambientes mediterráneos ibéricos	Gortázar et al. 2008; Naranjo et al. 2008b
Control	Reducir significativamente el número de jabalíes reduce la prevalencia de TB en jabalí, y la incidencia en ciervos y bovinos	Aplicación en intervenciones de control poblacional	Boadella et al. 2012b
Control / Epidemiología	Desarrollo de métodos novedosos para estimas de abundancia y agregación en ungulados silvestres	Métodos de aplicación en epidemiología, en vigilancia sanitaria y en el seguimiento de intervenciones de control poblacional	Acevedo et al. 2007; 2008
Control	Descubrimiento de ADN del complejo <i>M. tuberculosis</i> en barro de puntos de agua y otras muestras ambientales; conocimiento detallado del uso del espacio y de las interacciones intra- e inter-específicas	Intervenciones para mejora de la bioseguridad en sistemas ganaderos extensivos	Barasona et al. 2014a; 2014b y trabajos en preparación
Epidemiología	Identificación de factores de riesgo que determinan la prevalencia de TB en fauna silvestre: densidad, agregación, distribución de puntos de agua, alimentación suplementaria, genética...	Posibilidades para una gestión cinegética con consideración de aspectos sanitarios	Acevedo-Whitehouse et al. 2005; Vicente et al. 2007a; 2007b; Gortázar et al. 2011b; Queirós et al. 2014

## 7. CONOCIMIENTO Y MANEJO DE LA INTERACCIÓN ENTRE EL GANADO EXTENSIVO Y LA FAUNA SILVESTRE

*SaBio IREC (Universidad de Castilla – La Mancha @ CSIC)*

Contacto: Joaquín Vicente (joaquin.vicente@uclm.es)

### *Historia*

La interacción entre el ganado y los ungulados silvestres limita el éxito final de las estrategias de erradicación de enfermedades compartidas en España, y es de especial relevancia para la tuberculosis animal entre otras enfermedades compartidas. Desde hace más de una década se ha avanzado en el conocimiento de los factores de riesgo de la transmisión de las enfermedades compartidas en nuestro país. Desde 2007, el grupo SaBio ha investigado aspectos de la ecología y manejo de la interacción entre el ganado extensivo y ungulados silvestres en ambientes mediterráneos. Inicialmente, mediante el proyecto de investigación “Interacciones entre ungulados cinegéticos y riesgos de transmisión de la tuberculosis en Castilla-La Mancha” (PA107-0062-6611), financiado por la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha. Este proyecto se complementó con “Epidemiología molecular, epidemiología de campo y factores de riesgo biogeográficos asociados a la interacción sanitaria entre ungulados domésticos y silvestres” (FAU2008-00004-Co3-01), financiado por el INIA a través de la Acción Movilizadora “Interacción sanitaria entre fauna silvestre y ganadería extensiva”, participado por el grupo VISAVET de la Universidad Complutense de Madrid. Estos proyectos han permitido dar los primeros pasos en el conocimiento de la ecología y epidemiología de la interacción entre ungulados silvestres (jabalí y ciervo) y ganado extensivo del centro sur de España.

La investigación continuó desde entonces mediante el proyecto del Plan Nacional “Factores de riesgo y epidemiología espacio-temporal de la tuberculosis en bovino extensivo: un modelo para el control de la enfermedad” (AGL2010-20730), en el que ha participado la Universidad de Sevilla y la Estación Biológica de Doñana. Ha resultado en los siguientes hitos:

1. Determinantes del patrón espacio-temporal de persistencia y transmisión de la tuberculosis en zonas de interacción entre ganado y fauna en ambientes mediterráneos.

2. Evaluación del efecto de la reducción poblacional de jabalíes sobre la persistencia de la tuberculosis en ganado bovino.

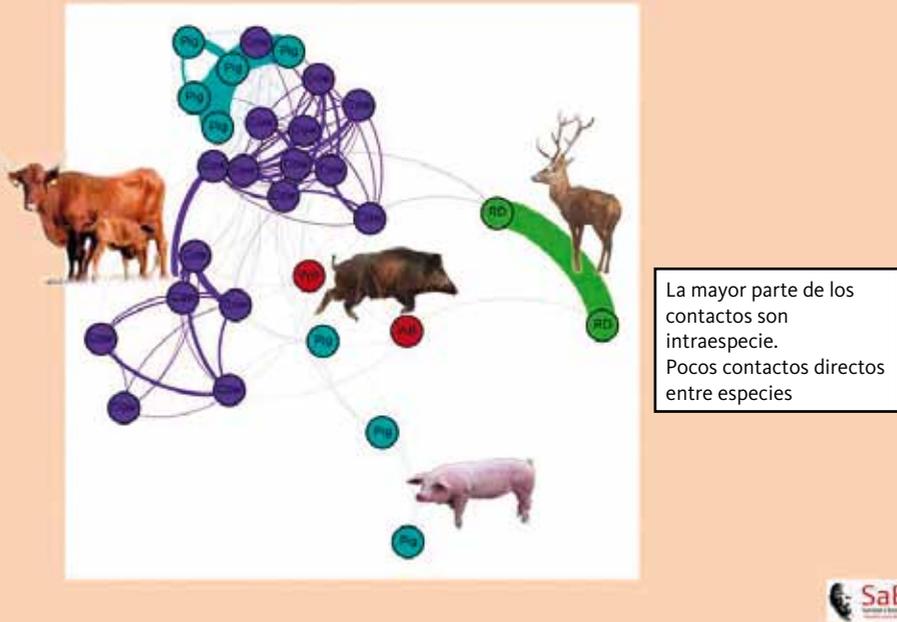
3. Descripción de las interacciones inter e intra-específicas de interés en la transmisión de la tuberculosis entre ganado y ungulados silvestres del Parque Nacional de Doñana mediante técnicas de telemetría e imágenes de alta resolución captadas con drones.

4. Evaluación de manejos preventivos que disminuyen las tasas de contacto directas e indirectas entre ganado y ungulados silvestres. Se han diseñado métodos de segregación selectivos, particularmente, una puerta selectiva y operable solamente por ganado bovino.



**Figura 1.** Ejemplo de imagen aérea y georreferenciada obtenida mediante vuelo no tripulado, revelando la presencia conjunta de ganado bovino y gamos. (Foto Aeromab-EBD)

## La red social de la tuberculosis



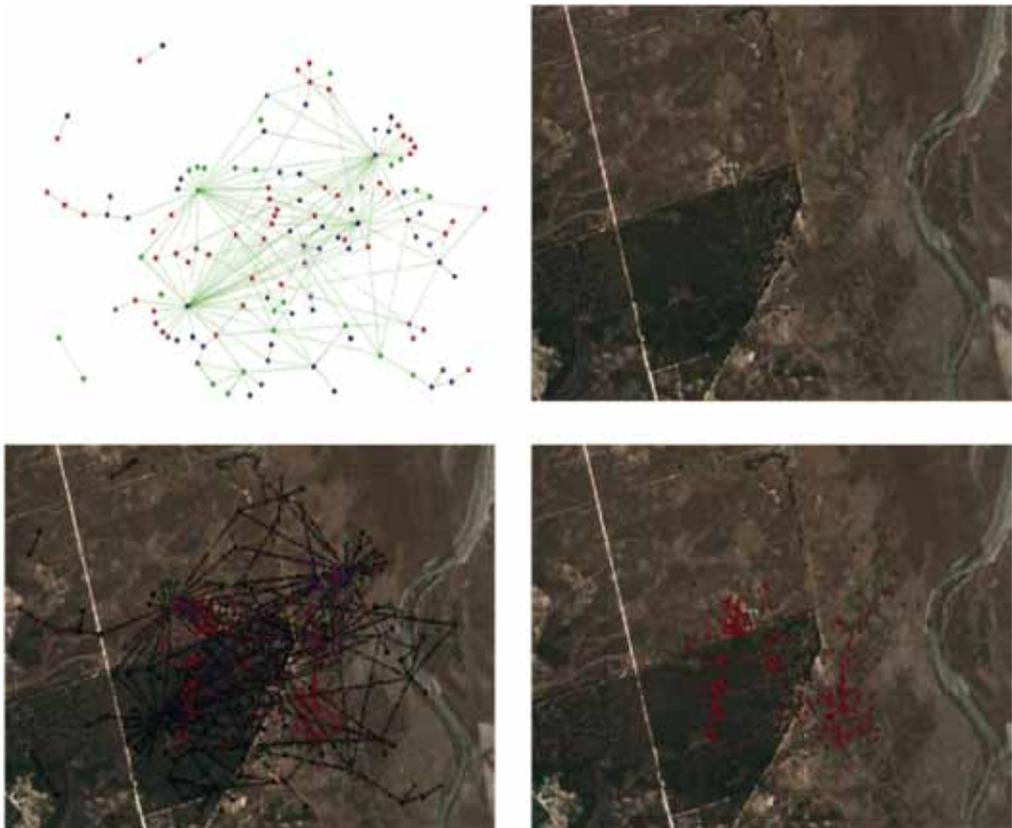
**Figura 2.** Ejemplo de red de interacción real entre los individuos de poblaciones hospedadoras de tuberculosis en una comunidad típica de un sistema extensivo del centro sur de España. Está definida por los nodos y líneas de interacción, caracterizadas por la frecuencia y la intensidad de las interacciones (grosor de líneas). Cow: Bovino, Pig: Cerdo Ibérico, WB: Jabalí, RD: Ciervo. Fuente: Cat Cowie, SaBio-IREC.

### Actualidad

En 2014 arrancó el proyecto del Plan Nacional “Desarrollo de protocolos de mitigación del riesgo de contacto y transmisión de enfermedades compartidas entre ganado y ungulados silvestres (AGL2013-48523)”. Este proyecto pretende desarrollar protocolos de mitigación del riesgo de transmisión de las enfermedades infecciosas en sistemas extensivos de ungulados del centro y sur de España. En particular, los objetivos y resultados concretos esperados son:

1. Describir el patrón espacio-temporal de contactos entre ungulados domésticos en extensivo y silvestres (incluyendo especies aun poco estudiadas: pequeños rumiantes, cerdo y ciervo).
  - a. Describir y cuantificar el uso compartido del espacio a una escala espacial muy detallada mediante el seguimiento de individuos portadores de registradores de proximidad y GPS.
  - b. Desarrollar modelos predictivos (análisis de redes neuronales) del riesgo de contacto mediante la identificación de los factores responsables del patrón de contactos.

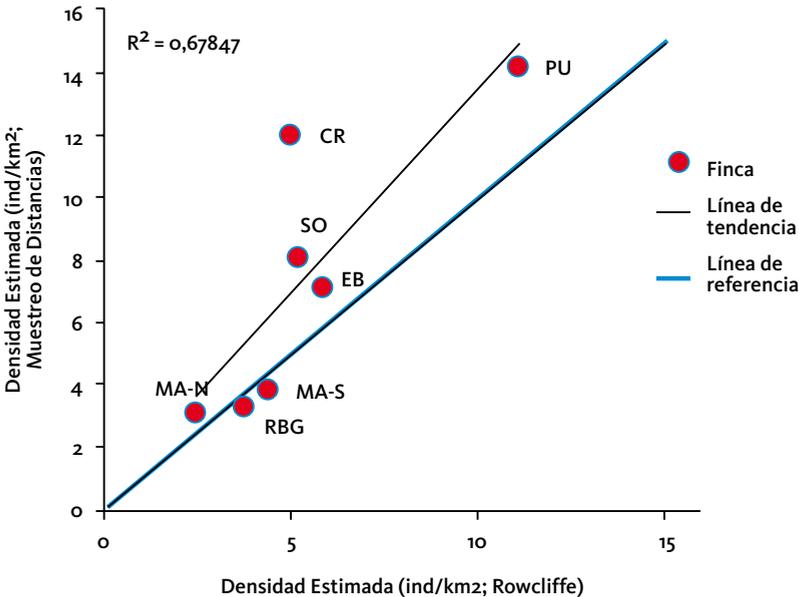
2. Identificar los factores determinantes de la transmisión y persistencia de diferentes enfermedades compartidas en zonas de contacto en el centro y sur de España.
  - a. Puesta a punto del método de recolección de fluido oral en poblaciones de jabalí.
  - b. Excreción de patógenos en bovino, jabalí y cérvidos.
  - c. Microbiología ambiental de puntos de riesgo para la transmisión de enfermedades.
  - d. Modelar la transmisión y persistencia de enfermedades compartidas en zonas de contacto.
3. Desarrollar y trasladar a la administración (sector ganadero en general) protocolos efectivos de evaluación del riesgo de contacto, como base para implementar programas específicos de mitigación del riesgo de transmisión de enfermedades compartidas en explotaciones ganaderas extensivas del centro y sur de España.



**Figura 3.** Mediante un ejemplo hipotético, se muestran sucesivas aproximaciones hasta la integración total (inferior izda) de la información generada a partir de la red neuronal de contactos (superior izda) entre individuos con dispositivos registradores de contacto y GPS. Se representa la distribución de factores ambientales (superior dcha), y el geoposicionamiento de individuos portadores de registradores de proximidad (inferior dcha).

## Futuro

Esperamos que nuestros resultados permitan a la administración, ganaderos y a los demás sectores implicados en la lucha frente a las enfermedades compartidas entre ganado extensivo y ungulados silvestres (con especial atención a la tuberculosis) disponer de un protocolo de evaluación de riesgos de contacto. Éste permitirá instaurar programas de mitigación del riesgo frente a enfermedades compartidas específicos en cada explotación extensiva del centro y sur de España, lo que contribuirá al éxito de las estrategias de control y erradicación de las enfermedades. Con la premisa de una intensa cooperación científica entre grupos, pretendemos realizar trabajos principalmente observacionales, muy aplicados, respondiendo a la necesidad de resolución de los problemas en la ganadería extensiva. El uso de nuevas tecnologías y herramientas de diagnóstico (por ejemplo la presencia ambiental del CMT) y de caracterización de la interacción entre fauna y ganado será esencial en nuestra futura investigación, lo que abre posibilidades de colaboración entre grupos de investigación, también con proyección internacional. También es fundamental el desarrollo de herramientas que nos permitan caracterizar las poblaciones de estudio y su evolución para evaluar riesgos desde escalas locales a continentales. Por ello, trabajaremos en métodos de seguimiento poblacional que sean prácticos y sensibles a las variaciones espacio-temporales de las poblaciones, y a la vez, estandarizados entre áreas muy diversas (por ejemplo a nivel continental) especialmente aplicable al caso del jabalí, especie metodológicamente problemática, y de importancia para la tuberculosis y otras enfermedades.



**Figura 4.** Relación entre los valores de densidad de jabalí determinados mediante fototrampeo y la aplicación del método descrito por Rowcliffe en 2008, y la densidad de jabalíes estimada con el muestreo de distancias para las fincas de estudio. Fuente: SaBio-IREC.

## Resumen

Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB			
Campo	Resultado	Aplicación	Referencias
Epidemiología	Identificación de los determinantes del patrón espacio-temporal de persistencia y transmisión de la TB en zonas de interacción entre ganado y fauna en ambientes mediterráneos	Sólo conociendo los factores de riesgo (por ejemplo disponibilidad de agua, agregación espacial, densidad...) es posible plantear medidas de intervención	Vicente et al. 2006; 2007a; Barasona et al. 2014a; 2014b
Control	Evaluación del efecto de la reducción poblacional de jabalíes sobre la persistencia de la TB en ganado bovino	Demostración empírica del papel del jabalí como reservorio  Identificación de la importancia de evitar la sobreabundancia de jabalíes en el marco del control de la TB  Identificación de la importancia de reducir los contactos indirectos entre bovinos y ungulados silvestres	Boadella et al. 2012b; Barasona et al. 2013b
Epidemiología	Descripción de las interacciones inter e intra-específicas de interés en la transmisión de la TB entre ganado y ungulados silvestres: la transmisión entre especies es principalmente indirecta	Posibilidad de intervenir en los lugares de mayor riesgo para la transmisión indirecta de CMT, por ejemplo en puntos de agua o comederos	Barasona et al. 2013b; 2014a; 2014b
Control	Evaluación de manejos preventivos que disminuyen las tasas de contacto directas e indirectas entre ganado y ungulados silvestres	Se han diseñado métodos de segregación selectivos, particularmente, una puerta selectiva y operable solamente por ganado bovino	Barasona et al. 2013b

## 8. VACUNACIÓN

---

**Consortio SaBio IREC (Universidad de Castilla – La Mancha @ CSIC)  
– NEIKER Tecnalia – VISAVET/U. Complutense**

Contacto: Christian Gortázar (christian.gortazar@uclm.es)

### **Historia**

Este consorcio informal lleva colaborando desde 2007, cuando arrancó el proyecto “Control de la tuberculosis bovina en su principal reservorio silvestre en España, el jabalí, mediante vacunación (FAU2006-00017)”. Ese proyecto, financiado por el INIA a través de la Acción Movilizadora “Interacción sanitaria entre fauna silvestre y ganadería extensiva”, permitió dar los primeros pasos en vacunación de jabalíes, tales como la puesta a punto del modelo de infección experimental y los primeros marcadores de respuesta a la infección y a la vacunación con *M. bovis* BCG (Ballesteros et al. 2009). Además, el proyecto permitió diseñar y patentar un cebo y un comedero selectivo para la administración de la vacuna oral en condiciones de campo (Beltrán-Beck et al. 2012). La financiación se vio complementada con una ayuda del Banco Santander que actuó como catalizador durante los primeros años.

La línea de investigación sobre vacunación tuvo continuidad a través del proyecto europeo “TB-STEP Strategies for the eradication of bovine tuberculosis (FP7KBBE; Grant 212414, 2009-2011)” y el proyecto nacional AGL2011-30041. En esta etapa (2009-2014) se ampliaron las colaboraciones con otros grupos afines, como CReSA o SERIDA. La investigación continuó tanto en el laboratorio, con numerosos ensayos en jabalí y los primeros ensayos en cerdo, como en el campo, con la primera vacunación en condiciones reales, resultando los siguientes hitos:

- La revacunación mejora la eficacia de *M. bovis* BCG (Gortázar et al. 2014).
- Mediante cebos y comederos selectivos es posible alcanzar con vacunas a más del 80% de los rayones en condiciones de campo, de forma selectiva y segura (Ballesteros et al. 2011; Beltrán-Beck et al. 2012; 2014b).
- Gracias al empeño personal del Dr. R. Juste (NEIKER) se descubre la capacidad protectora de *M. bovis* inactivado por calor (Garrido et al. 2011; Beltrán-Beck et al. 2014c).

- Se comprueba que *M. bovis* inactivado por calor también es eficaz en cerdos (Beltrán-Beck et al. 2014a).
- Se conocen nuevos aspectos del mecanismo protector de *M. bovis* inactivado por calor (Beltrán-Beck et al. 2014a; 2014c).
- Primeros resultados de protección de rayones en pruebas de campo, superior al 90% (publicaciones en preparación).

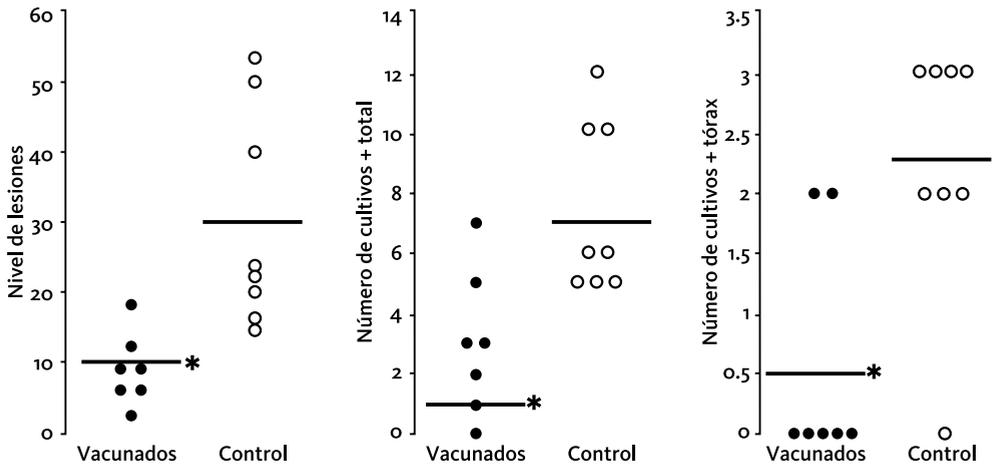


**Figura 1.** Arriba: jaula-comedero selectivo para rayones. Los adultos no logran entrar, de forma que colocando los cebos (abajo) en las mismas se logra administrar vacunas de forma selectiva a los rayones. (Fotos: SaBio-IREC)

## Actualidad

En 2014 arrancó el proyecto europeo “Integrated solutions for tuberculosis control in animals combining vaccination and multispecies diagnostics (WildTBVac, Grant 613779)” y en 2015 el proyecto nacional “Micobacterias inactivadas por calor como inmunógenos en rumiantes: vía de administración, respuesta del hospedador y diagnóstico (AGL2014-56305)”. Entre ambos proyectos, uno continuando la línea jabalí/porcino y otro abriendo el campo de exploración hacia los rumiantes silvestres y domésticos, se logra la continuidad de la investigación sobre vacunas, y del consorcio.

Por un lado siguen realizándose ensayos con jabalíes y con cerdos, en condiciones de laboratorio, a fin de ampliar conocimientos sobre los mecanismos de protección y descubrir posibles sinergias o interferencias entre distintos productos con capacidad inmunógena. Además, se han mejorado las técnicas de diagnóstico basadas en ELISA hasta el punto de lograr sensibilidades superiores al 90% y especificidades próximas al 100% en porcino (Boadella et al. 2011b; Beltrán-Beck et al. 2014a). En el campo, el ensayo de vacunación de jabalíes continúa, estando prevista su finalización al final de la temporada de muestreo 2015/2016. Para la modelización de los resultados se cuenta con colaboraciones internacionales con las Universidades de York y Edimburgo.



**Figura 2.** Resultados obtenidos tras vacunar jabalíes con *M. bovis* inactivado por calor, y exponerlos después a reto con una cepa de campo. Los jabalíes vacunados presentan significativamente menos lesiones y menos número de cultivos positivos. Fuente: modificado de Beltrán-Beck et al. 2014c.

Por otro lado se están comenzando experimentos de inmunización y en algunos casos de reto con tres especies de rumiantes, uno silvestre (ciervo) y dos domésticos (cabra y vaca), además de existir colaboraciones con grupos nacionales (SERIDA, CReSa y empresas) e internacionales (APHA en Reino Unido, USDA en EUA, y Universidad de Pretoria en Sudáfrica)

en relación con ensayos en tejón y en oveja, entre otros temas. Estos experimentos permiten profundizar en el conocimiento básico de la respuesta de los rumiantes a la vacunación y a la infección. En relación con el ciervo, además, se trabaja en el desarrollo de cebos apropiados para la distribución de vacunas o inmunoestimulantes orales en condiciones de campo, siguiendo los pasos de la experiencia previa con el jabalí.

## **Futuro**

El objetivo general del consorcio es contribuir, a través del desarrollo de vacunas o inmunoestimulantes así como de tecnologías para su aplicación y distribución, al control de la tuberculosis animal y, potencialmente, aportar también conocimientos al control de la tuberculosis humana. Para ello se desarrollarán los siguientes objetivos:

### **1. Llevar a mercado los resultados desarrollados hasta la fecha, en relación con el control de la tuberculosis en el jabalí y el porcino.**

Algunas de las herramientas desarrolladas son susceptibles de transferencia, como ya ocurre por ejemplo con el kit ELISA TB comercializado por VACUNEK, spin-off de NEIKER. Para continuar en este camino se trabajará en colaboración con empresas de los sectores veterinario, farmacéutico y ganadero.

### **2. Evaluar el potencial de *M. bovis* inactivado por calor para el control de la tuberculosis en rumiantes.**

Resultados muy preliminares sugieren que la administración oral de micobacterias inactivadas por calor en rumiantes produce respuesta y no interfiere con el diagnóstico. En consecuencia, este campo resulta prometedor y exigirá un elevado esfuerzo de I+D en el próximo lustro.

### **3. Explorar otras posibles aplicaciones de la inmunoestimulación oral con organismos inactivados por calor.**

El descubrimiento de que es posible obtener respuesta protectora a partir de la administración oral de un microorganismo inactivado por calor abre numerosas posibilidades e hipótesis, algunas de las cuales se procurará investigar en los próximos años.



**Figura 3.** Vacunación experimental de cabritos. En 2015 el consorcio SaBio IREC – NEIKER – VISAVET comienza varios experimentos de vacunación en cabritos, terneros, y ciervos, algunos de ellos en colaboración con otros grupos de I+D nacionales e internacionales. Los resultados permitirán comprobar si el efecto protector de las vacunas inactivadas se limita a los suidos o es extensivo a los rumiantes. Esto supondría un hito importante en la lucha contra la tuberculosis animal.

## Resumen

### Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB

Campo	Resultado	Aplicación	Referencias
Diagnóstico	Técnicas ELISA mejoradas para detección anticuerpos frente a CMT en porcino y en jabalí	Diagnóstico y protocolos de testado y eliminación selectiva en porcino y jabalí	Boadella et al. 2011b; Beltrán-Beck et al. 2014a
Control	Viabilidad, seguridad y selectividad del uso de <i>M. bovis</i> BCG en jabalíes, preferentemente mediante re-vacunación	Vacunación de jabalíes	Gortázar et al. 2014
Control	Viabilidad, seguridad y selectividad del uso de <i>M. bovis</i> inactivado por calor en cerdos y en jabalíes, preferentemente mediante re-vacunación	Vacunación de jabalíes. Posibilidad futura vacunación en cerdos	Beltrán-Beck et al. 2012; 2014b; 2014c



## 9. LAS MICOBACTERIOSIS, UNA CONSTANTE EN LA MEDICINA VETERINARIA DE BIZKAIA DURANTE MÁS DE 60 AÑOS

---

*Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (NEIKER-Tecnalia)*

Contacto: Ramón A. Juste (rjuste@neiker.eus)

### **Historia**

Las micobacteriosis en general y la tuberculosis en particular han sido históricamente dos de las principales líneas de trabajo de NEIKER. Los antecedentes se remontan a 1953 cuando Jesús Cuezva Samaniego inicio en Bizkaia el primer programa continuo de control de la tuberculosis bovina en España. Este interés por la tuberculosis se consolidó con la construcción del Laboratorio Pecuario Regional en Derio y su declaración como centro nacional de referencia de la tuberculosis bovina, y con la publicación de su obra “Erradicación de la Tuberculosis Bovina (ETB)” en 1966, un modelo de trabajo científico aplicativo todavía válido. La transferencia a la Comunidad Autónoma de dicho laboratorio le hizo perder su calidad de centro de referencia, pero le permitió mantener el interés por las micobacteriosis, de manera que, ya como SIMA, en 1983 el Dr Juste revisó el diagnóstico mediante la técnica oficial de intradermorreacción y realizó la primera descripción de paratuberculosis bovina en España. Desde entonces el grupo de NEIKER ha participado en numerosos proyectos de Investigación tanto europeos como estatales y autonómicos orientados principalmente al estudio epidemiológico, diagnóstico y control de las principales micobacteriosis de los animales domésticos y de la fauna silvestre, como son la tuberculosis y la paratuberculosis. En lo que a la tuberculosis respecta, el centro, además de asesorar a las autoridades competentes de la Comunidad Autónoma del País Vasco, ha sido el encargado de la confirmación mediante técnicas microbiológicas e histopatológicas de los casos sospechosos de tuberculosis detectados en el seno de las campañas de saneamiento, obligatorias desde 1983. Además, ha colaborado desde 2001 con IREC y VISAVET en varios estudios epidemiológicos sobre tuberculosis en fauna silvestre y en el desarrollo de nuevos productos inmunoestimulantes para el control de la enfermedad en jabalí en el marco de cuatro proyectos del Plan Nacional y dos europeos, de los cuales uno está en vigor y en el que NEIKER participa como coordinador. NEIKER dispone de instalaciones y personal cualificado para realizar experimentación animal e “in vitro” en nivel BS3 aumentado, así

como capacidad de producción de inmunoestimulantes del complejo *M. tuberculosis* para uso en campo. NEIKER lleva casi tres décadas ensayando y documentando el uso de la vacunación para el control de la paratuberculosis que alcanza ya el noveno año de seguimiento en ganado bovino. Este ensayo de campo, único en Europa, está enfocado no sólo en la eficacia, que se ha demostrado muy alta, tanto en producción lechera y longevidad, como en excreción fecal de *M. a. subsp. paratuberculosis* (MAP), sino en la interferencia con el diagnóstico de la tuberculosis, que se ha visto que es escasa y fácilmente controlable. Como consecuencia de todos estos años de trabajo, se dispone de un amplio cepario de micobacterias perfectamente caracterizado. El grupo de micobacterias está formado en estos momentos por cinco investigadores, dos técnicos, dos analistas y dos becarios.

Finalmente, NEIKER está Certificado por AENOR para la gestión de Proyectos de Investigación según la norma UNE-EN ISO 9001: 2000.

### **Actualidad**

En estos momentos se dispone de un modelo experimental de tuberculosis en jabalí que ha permitido ver el efecto del producto *M. bovis* inactivado (EMDIAR) desarrollado por el consorcio NEIKER-IREC-VISAVET utilizando diferentes pautas de administración en comparación con la BCG. Los resultados obtenidos demostraron mejor tasa de protección en términos de número, tamaño y localización de las lesiones observadas, así como de carga bacteriana.

Igualmente, se dispone de un modelo experimental de tuberculosis en terneros con el que se pudo demostrar que la vacunación frente a paratuberculosis con una vacuna inactivada tenía un efecto favorable en el control de la tuberculosis bovina en base al número y volumen de lesiones observadas.

En el caso de la paratuberculosis se dispone de un modelo de infección experimental en conejos. Este modelo ha sido útil para conocer que pequeños cambios en la dieta pueden tener influencia en la instauración de la infección por MAP. Además, se ha observado que la vacunación frente a paratuberculosis con una vacuna inactivada ejerce un efecto diferente a nivel de respuesta inmune humoral y celular según se aplique antes o después del desafío con MAP.

Desde el año 2005 se está llevando a cabo un ensayo experimental de campo para el control de la paratuberculosis bovina. En este ensayo se comparan los resultados obtenidos en seis explotaciones que siguen una estrategia de saneamiento en base a serología y excreción de MAP con las heces, con otra basada en la vacunación llevada a cabo en otras 20 explotaciones. Por otra parte, se analiza la posible interferencia de las infecciones naturales por MAP y de la vacuna en el diagnóstico de la tuberculosis en base a la intradermorreacción comparada y a la producción de gamma-Interferón ( $\gamma$ -IFN).

NEIKER está desarrollando un modelo de infección “*ex vivo*” basado en la captura y lisis de micobacterias por macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica de ruminantes que ha permitido demostrar la existencia de un mecanismo primitivo e inespecífico, pero muy eficiente, de protección con escasa huella inmunológica específica con un gran potencial médico ya que, contra la opinión prevalente hasta hace muy poco, puede ser activado por células muertas.

NEIKER también ha realizado un estudio histopatológico y epidemiológico en ganado bovino que ha permitido definir tres formas de paratuberculosis que se han podido asociar

con unos genotipos relacionados con la inmunidad innata que no solo confirman el papel relevante de este tipo de inmunidad en la patogenia de las micobacteriosis y, en particular, de las asociadas con enfermedad inflamatoria intestinal, sino que permiten contemplar la perspectiva de añadir la herramienta genética al control de las micobacteriosis y otras enfermedades de similar patogenia.

En cuanto a técnicas de diagnóstico (bacteriológico, inmunológico e histopatológico) y caracterización de micobacteriosis NEIKER dispone de:

- Cultivo convencional en medios sólidos y líquidos
- Cultivo automático en medio líquido MGIT-BACTEC
- PCRs convencionales específicas de especies y subespecies micobacterianas
- PCRs en tiempo real de formato múltiple (doble, triple y cuádruple) y específicas de especie, subespecie o complejos micobacterianos
- Identificación de miembros de los complejos *M. tuberculosis* y *M. avium* mediante arrays de microesferas en suspensión (Luminex)
- Identificación de micobacterias por medio de secuenciación de diferentes regiones genéticas 16S rRNA e 16S-23S rRNA ITS
- Caracterización genética de cepas para estudios de epidemiología molecular: Espoligo-tipado, MIRU-VNTR, PFGE, RFLP, SSR...
- Detección de respuesta inmune por medio de ELISA, IGRA (interferón-gamma), intradermotuberculinización (simple y comparada) utilizando diferentes antígenos convencionales y no convencionales
- Estudio anatomo-histopatológico de animales y muestras

Los proyectos en vigor en estos momentos en el ámbito de las micobacteriosis son:

1. Micobacterias inactivadas por calor como inmunógenos en rumiantes: vía de administración, respuesta del hospedador y diagnóstico. Financiador: MINECO
2. Integrated solutions for Tuberculosis control in animals combining vaccination and multi-species diagnostics. Financiador: EU FP7
3. Valoración de la seguridad y eficacia de la vacunación en el control de la paratuberculosis en el País Vasco. Financiador: Gobierno Vasco (GV)-DDFF
4. Desarrollo de modelos de patogenia e inmunización en paratuberculosis. Financiador: MINECO
5. Interacciones bacteria-hospedador en infecciones con *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map): Susceptibilidad de los rumiantes domésticos a la infección con distintos genotipos de Map. Financiador: INIA
6. Optimización y estandarización de la producción y del protocolo de administración de un preparado vacunal contra la tuberculosis bovina. Financiador: GV
7. Desarrollo de nuevos métodos moleculares para la detección e identificación de micobacterias responsables de zoonosis en productos ganaderos. Financiador: GV

8. Vigilancia sanitaria de las especies silvestres en la Comunidad Autónoma del País Vasco. Financiador: GV

9. Desarrollo y evaluación de nuevos productos vacunales frente a la paratuberculosis bovina. Financiador: GV-DDEC



**Figura 1.** Imágenes de diferentes ensayos, tanto a nivel de campo como en condiciones de animalario, llevados a cabo por NEIKER en el ámbito de las micobacteriosis. Todos los ensayos con *M. bovis* son llevados a cabo en las instalaciones de alta seguridad biológica. (Fotos: NEIKER)

### **Futuro**

1. Puesta a punto de modelos en otras especies susceptibles de ser incluidas en planes de control frente a tuberculosis.
2. Estudio de las posibles interferencias ocasionadas por la vacunación frente a paratuberculosis en el diagnóstico de la tuberculosis.
3. Analizar diferentes rutas, posibilidad de reinmunizaciones y concentraciones de antígeno para encontrar un equilibrio óptimo entre protección e interferencia diagnóstica.
4. Estudio del efecto protector frente a la infección por *Mycobacterium bovis* de la vacuna frente a paratuberculosis.
5. Continuar con el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico y caracterización de las micobacteriosis.
6. Estudio de la interacción entre fauna silvestre y especies domésticas en el entorno de explotaciones bovinas positivas a tuberculosis del norte peninsular.
7. Evaluación de la seguridad y la eficacia de productos inmunoestimulantes en tejonos desafiados con *Mycobacterium bovis*.

## Resumen

Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB			
Campo	Resultado	Aplicación	Referencia
Control	Revisión IDTB y análisis de resultados	Soporte de campañas de control en bovino	Ferrer y Juste 1983; Juste 1989
Diagnóstico	ELISA	TB suidos y gamos	Aurtenetxe et al. 2008; Prieto et al. 2014a
Diagnóstico	PCR multiplex	Identificación rápida de micobacterias patógenas	Sevilla et al. 2015
Control	Vacunas micobacterianas	Protección frente a TB y paratuberculosis en varias especies	Bastida y Juste 2011; Garrido et al. 2011; Alonso-Hearn et al. 2012; Pérez de Val et al. 2012a; Garrido et al. 2013; 2014; Díez-Delgado et al. 2014; Juste et al. 2014
Diagnóstico	Varias técnicas	Diagnóstico de la TB en camélidos sudamericanos	Inchausti et al. 1997
Patogenia	Modelo de enfermedad inflamatoria	Evaluación de factores de patogenia y protección	Arrazuria et al. en prensa; Arrazuria et al. en prensa
Patogenia	Caracterización de tipos epidemio-patológicos	Definición de características de la enfermedad inflamatoria intestinal en bovino	Vázquez et al. 2013a; 2013b; 2014a
Patogenia	Desarrollo de modelos <i>in vitro</i> de infección micobacteriana	Comparación de la virulencia y riesgos de diversas cepas de MAP. Diseño de estrategias de control y diferenciación vacunación/infección	Abendaño et al. 2013a; 2013b; 2014; Fitzgerald et al. 2014
Patogenia	Identificación y asociación de factores genéticos con formas de paratuberculosis	Identificación de factores de riesgo en la patogenia de la paratuberculosis y otras infecciones intracelulares	Ruiz-Larrañaga et al. 2010a; 2010b; 2010c; 2011a; 2011b; 2012; Vázquez et al. 2014b



## 10. ESTRATEGIAS PARA LA MEJORA DE LA EFICACIA DE LOS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO EN LAS CAMPAÑAS DE SANEAMIENTO DE TUBERCULOSIS CAPRINA

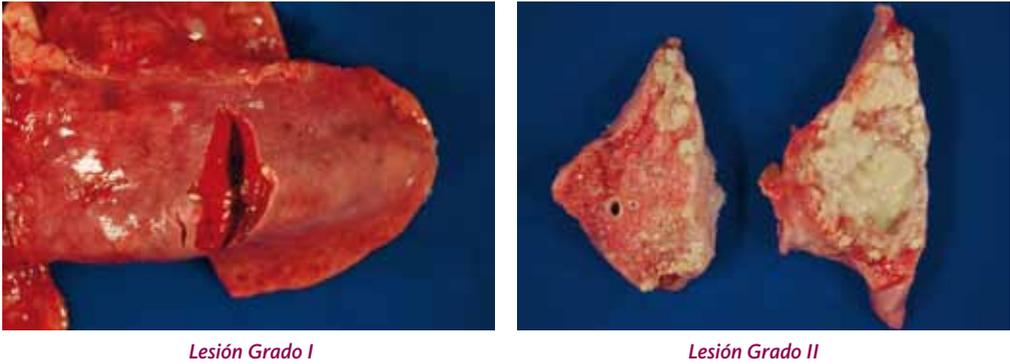
---

*Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia (UM)*

Contacto: Joaquín Navarro (jnavarro@um.es)

### **Historia**

Desde 1995, año en que se inició en la Región de Murcia el programa de control y erradicación de tuberculosis caprina, nuestro grupo ha venido realizando necropsias para la confirmación de los diagnósticos, particularmente frente a los resultados dudosos. Ello permitió la descripción de los cuadros lesionales y el reconocimiento de la tuberculosis como una enfermedad de especial importancia en el caprino, realizándose además estudios sobre la inmunopatología de la enfermedad (Figura 1). El desarrollo de la campaña, aunque consiguió disminuir en gran medida el porcentaje de explotaciones afectadas, no evitó que la incidencia anual siguiera siendo alta. Ello hacía sospechar de la presencia de falsos negativos que mantenían la infección en los rebaños. En consecuencia se hacía necesario establecer estrategias que aceleraran, y al mismo tiempo aseguraran, la erradicación de la tuberculosis de los rebaños infectados. Aunque la intradermorreacción tuberculínica comparada (IDTC) utilizada en la campaña se ha demostrado muy específica y bastante sensible en estudios previos en ganado caprino, tras una revisión sobre los técnicas de diagnóstico *in vivo* basadas en la inmunidad celular (IDTC y  $\gamma$ -IFN) y la detección de anticuerpos, Bezos et al. (2012) destacan la necesidad de estudios con un elevado número de animales, así como sobre rebaños libres de tuberculosis.



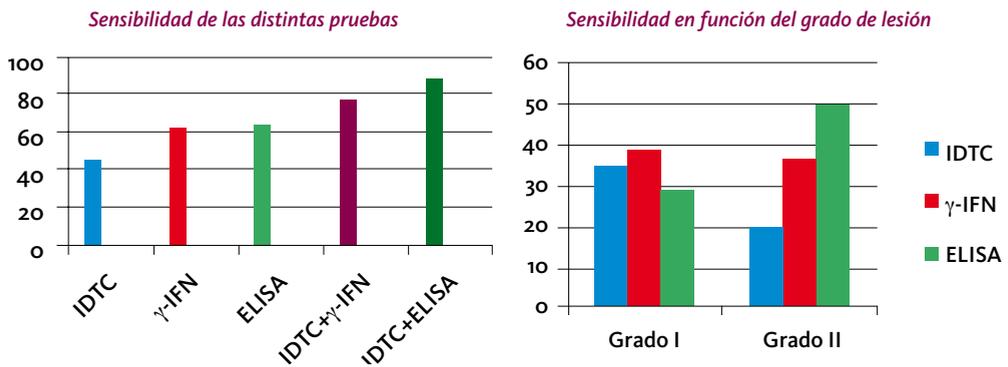
**Figura 1.** Tipos de lesiones en cabras infectadas naturalmente con el complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Izquierda: Lesión grado I, pequeño nódulo caseificado y prominente en el parénquima pulmonar. Derecha: Lesión grado II, parénquima pulmonar con varios nódulos blanquecinos confluyentes a área ocupada por material caseoso. (Fotos: Universidad de Murcia)

### Actualidad

Durante el desarrollo del proyecto “Estrategias para la mejora del diagnóstico en la erradicación de la tuberculosis caprina: análisis de los mecanismos inmunológicos implicados en los falsos negativos en la intradermorreacción tuberculínica comparada” entre los años 2010 y 2012, se evaluó la efectividad de los resultados de las técnicas de diagnóstico IDTC,  $\gamma$ -IFN y la detección de anticuerpos mediante ELISA en distintos tipos de rebaños, parte de cuyos resultados han sido comunicados en congresos y publicados e incorporados a los programas de saneamiento de la Región de Murcia (Figura 2).

- **Rebaños con tuberculosis** (más del 10% positivos a la IDTC)

Las cabras positivas a cualquiera de las técnicas fueron sacrificadas y sometidas a necropsia. Se incluyó un grupo de animales negativos a las tres técnicas en cada explotación. Los animales con tuberculosis se clasificaron en dos grados.



**Figura 2.** Porcentaje de sensibilidad de las distintas pruebas diagnósticas realizadas. Izquierda: Porcentaje de cabras tuberculosas detectadas con cada prueba individualmente y cuando se combina la prueba oficial (IDTC) con el  $\gamma$ -IFN o el ELISA. Derecha: Porcentaje de cabras tuberculosas con lesión de grado I y con lesiones de grado II detectadas con cada prueba. Fuente: Universidad de Murcia.

Parte de estos resultados fueron publicados, subrayando los pobres resultados de la IDTC en explotaciones caprinas con un largo historial de tuberculosis (Buendía et al. 2013). Para explicar esta baja sensibilidad hay que tener en cuenta las sucesivas tuberculinizaciones. Se ha demostrado en vacuno que las tuberculinizaciones repetidas afectan de manera notable a la sensibilidad de la prueba (Coad et al. 2010). Las otras dos técnicas (ELISA y  $\gamma$ -IFN) presentaron una mayor sensibilidad, incrementándose ésta cuando se combinan las dos técnicas, por lo que para acelerar el saneamiento en este tipo de rebaños es recomendable utilizar otra técnica junto con la IDTC.

La primera ofrece una serie de ventajas: es más sencilla y económica, y ofrece mejores resultados en la detección de cabras con formas avanzadas de la enfermedad, que son potencialmente responsables de la transmisión y mantenimiento de la infección en las explotaciones. Cuando el ELISA se combina con la IDTC se obtienen los mejores resultados.

- **Rebaños libres de tuberculosis**

Todos los animales sometidos en paralelo a las pruebas de IDTC,  $\gamma$ -IFN y ELISA, fueron negativos, lo que apunta a una elevada especificidad de las tres técnicas.

- **Rebaños libres de tuberculosis y vacunados de paratuberculosis**

Las cabras vacunadas en los primeros meses de vida son negativas a las tres técnicas al año, lo que indica que la vacunación no parece afectar a la especificidad, pero sería necesario conocer sus efectos sobre la sensibilidad en rebaños con tuberculosis.

- **Rebaños libres de tuberculosis en los que aparecen un bajo número de cabras positivas a IDTC**

La falta de especificidad hace que animales no infectados (falsos positivos) sean eliminados, lo que supone graves contratiempos en aquellas explotaciones que previamente eran oficialmente libres de tuberculosis, o en las que continúan apareciendo un bajo número de animales positivos. Las cabras positivas de rebaños donde se sospechaba la existencia de animales falsos positivos son sometidas a necropsia y ELISA. Hay explotaciones donde se confirma la presencia de tuberculosis y explotaciones en las que los animales eran falsos positivos a la IDTC, en los cuales, además de la ausencia de lesiones tuberculosas, aparecían principalmente procesos de seudotuberculosis. La técnica de ELISA daba resultados negativos.

## **Futuro**

En los próximos años se realizarán nuevos estudios sobre la efectividad de los distintos métodos de diagnóstico *ante-mortem* de la tuberculosis, individualmente y combinados, en rebaños caprinos no sometidos y sometidos a tuberculinización. Se analizará la influencia de factores como la infecciones por *M. a. subsp. paratuberculosis*, *Corynebacterium pseudotuberculosis*, parasitaciones y vacunación frente a paratuberculosis. Además, se estudiarán las causas de ausencia de respuesta de animales infectados a los distintos métodos de diagnóstico (falsos negativos), o de respuesta de animales sin tuberculosis (falsos positivos), mediante el estudio de su respuesta inmune. Ello permitirá establecer nuevas estrategias para el control de la tuberculosis caprina.

**Resumen**

Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB			
Campo	Resultado	Aplicación	Referencia
Diagnóstico	En rebaños caprinos con incidencia media/alta de TB sometidos a saneamiento la prueba oficial muestra una baja sensibilidad siendo superior la de $\gamma$ -IFN y la detección de anticuerpos mediante ELISA	Mejora del diagnóstico en las campañas de saneamiento caprinas	Buendía et al. 2013
Diagnóstico	En rebaños caprinos sometidos a tuberculinizaciones sucesivas se requiere al menos una prueba complementaria a la oficial	Aumentar la detección de cabras con TB en rebaños sometidos a saneamiento	Buendía et al. 2013
Diagnóstico/ Epidemiología	El ELISA ofrece mejores resultados en la detección de cabras con formas avanzadas de la enfermedad, y cuando se combina con la IDTC se obtienen los mejores resultados	Aumentar la detección de cabras con fases avanzadas de TB responsables del mantenimiento de la infección en las explotaciones	Buendía et al. 2013

## 11. ESTUDIOS EPIDEMIOLÓGICOS DE LA TUBERCULOSIS BOVINA EN ESPECIES DOMÉSTICAS Y SILVESTRES EN EL SUR DE ESPAÑA

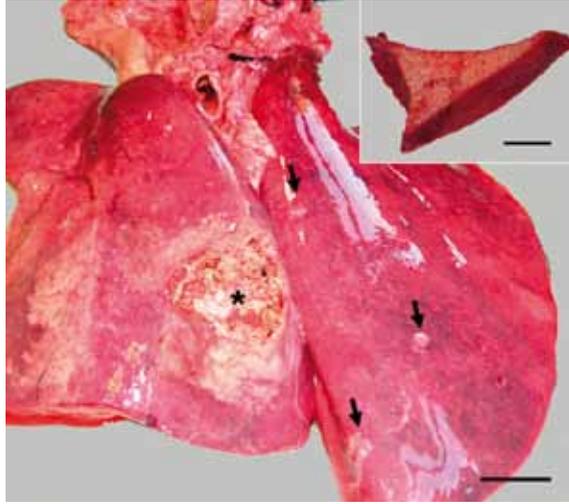
*Departamento de Sanidad Animal. Universidad de Córdoba (UCO)*

Contacto: Ignacio García Bocanegra (nacho.garcia@uco.es)

### *Historia*

El Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de Córdoba (<http://www.uco.es/organiza/departamentos/sanidadanimal/>) viene desarrollando trabajos de investigación relacionados con la epidemiología de enfermedades infecciosas y parasitarias en especies domésticas y silvestres desde hace más de 30 años. En la última década hemos realizado diversos estudios sobre tuberculosis en diferentes especies animales.

En los últimos años, se ha producido un incremento de camélidos como animales de compañía en diferentes regiones de España. Durante el período 2009 se remitieron al laboratorio de Enfermedades Infecciosas del Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de Córdoba tres ejemplares de alpacas (*Lama pacos*) muertos por un proceso agudo inespecífico. El diagnóstico laboratorial demostró infección por *M. bovis* en todos los animales analizados (Figura 1). El espoligotipo aislado (SBo295) indicó que los animales se infectaron en España. El estudio también señaló la dificultad en el diagnóstico *ante-mortem* de la tuberculosis en alpacas empleando las técnicas de diagnóstico oficiales actualmente disponibles para otras especies (García-Bocanegra et al. 2010).



**Figura 1.** Bronconeumonía granulomatosa, donde se puede observar un gran nódulo (asterisco) y nódulos pequeños (flechas), causada por *M. bovis* en alpaca (*Lama pacos*). (Foto: Universidad de Córdoba)

Posteriormente realizamos estudios, en colaboración con diversos grupos de investigación, relacionados con la epidemiología de la tuberculosis en poblaciones de artiodáctilos silvestres en Andalucía (Figura 2). Los resultados obtenidos indican una elevada diseminación de *Mycobacterium* del complejo tuberculosis en especies silvestres, fundamentalmente en jabalí. Así mismo, permitió evaluar la utilidad de técnicas inmunoenzimáticas en el diagnóstico de la enfermedad en estas especies (Boadella et al. 2011b; García-Bocanegra et al. 2012) e incorporar información sobre los espilogotipos más prevalentes en Andalucía (Rodríguez-Campos et al. 2012a).





**Figura 2.** (A) Junta de carne tras la actividad cinegética. Sierra Morena (Andalucía). (B) Detalle de extracción de sangre del seno de la duramadre en muflón (*Ovis musimon*). (C) Detalle de contenedor habilitado para la gestión de subproductos procedentes de una montería. (Fotos: Universidad de Córdoba)

### Actualidad

Diversos estudios han puesto de manifiesto en los últimos años el posible papel como reservorios de la tuberculosis en España, de distintas especies domésticas, incluyendo el caprino (Napp et al. 2013), ovino (Muñoz-Mendoza et al. 2015) o porcino (Di Marco et al. 2012).

Las cabras son muy susceptibles a la infección, presentando lesiones diseminadas, que implican la eliminación de micobacterias por leche y otras secreciones. Además, se ha demostrado que la presencia de tuberculosis en granjas de caprino puede resultar en infección de granjas de bovino cercanas (Napp et al. 2013).

Aunque el ovino es susceptible a la infección por *M. bovis*, siempre se ha considerado como “fondo de saco” epidemiológico. Sin embargo, la reciente detección de brotes en explotaciones ovinas junto con las extensas lesiones pulmonares detectadas, ponen de manifiesto un potencial papel de esta especie en la epidemiología de la tuberculosis (Muñoz-Mendoza et al. 2015).

Los cerdos, tanto domésticos como salvajes, son susceptibles a la infección (Rodríguez et al. 2011). El papel epidemiológico de los cerdos domésticos se considera poco relevante. Sin embargo, la situación es diferente en el caso de los cerdos de raza Ibérica criados en extensivo, con abundantes poblaciones en el sur y oeste de España, donde comparte recursos naturales con otras especies domésticas y silvestres.

Hasta la fecha, el número de estudios relacionados con la tuberculosis en otras especies domésticas (caprino, ovino, porcino), son escasos, quedando limitados a áreas geográficas muy concretas. Además, no existen datos sobre la prevalencia distribución y factores de riesgo relacionados con la tuberculosis en España en estas especies.

### **Futuro**

Durante el mes de octubre de 2014 se ha puesto en marcha un proyecto de investigación nacional titulado “Epidemiología de la tuberculosis bovina: factores de riesgo, aspectos sociológicos, papel de otras especies y eficacia de las medidas de control”. Se trata de un proyecto coordinado entre el Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA) y el Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de Córdoba. El objetivo general del proyecto es aumentar el conocimiento sobre la epidemiología de la tuberculosis en especies domésticas y evaluar la eficacia de la implantación de medidas de control frente a la tuberculosis en fauna silvestre en el ecosistema mediterráneo. Nuestro grupo de investigación junto con el CRESA pretende abordar los siguientes objetivos:

1. Establecer el papel epidemiológico que juega el caprino en la epidemiología de la tuberculosis en España.
2. Establecer el papel epidemiológico que juega el ovino en la epidemiología de la tuberculosis en España.
3. Establecer el papel epidemiológico que juega el porcino ibérico en la epidemiología de la tuberculosis en España.
4. Evaluar la evolución de la tuberculosis en artiodáctilos silvestres tras la implantación de la Orden de 2 de mayo de 2012, de control de subproductos animales no destinados al consumo humano y de sanidad animal en la práctica cinegética de caza mayor de Andalucía, y su efecto sobre el ganado doméstico en Andalucía.

## Resumen

Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB			
Campo	Resultado	Aplicación	Referencia
Epidemiología	Diagnóstico de casos de TB por <i>M. bovis</i> en alpacas en España	Mejora del conocimiento de reservorios domésticos de la TB	García-Bocanegra et al. 2010
Epidemiología	Conocimiento de la prevalencia, distribución y factores de riesgo de la TB en artiodáctilos silvestres en Andalucía	Identificación de factores implicados en la epidemiología de la TB en poblaciones silvestres	García-Bocanegra et al. 2012
Diagnóstico	Evaluación de diferentes antígenos empleados en el diagnóstico serológico de la TB en artiodáctilos silvestres	Realizar vigilancia epidemiológica en fauna silvestre. Optimización de recursos disponibles	García-Bocanegra et al. 2012



## 12. LA TUBERCULOSIS BOVINA COMO MODELO PARA EL CONTROL INTEGRAL DE LA SANIDAD ANIMAL EN ENTORNOS EXTENSIVOS

---

*Patología Infecciosa Veterinaria, Universidad de Extremadura (PATIN-UEx)*

*Servicio de Sanidad Animal y Servicio de Recursos Cinegéticos y Piscícolas-Consejería de Agricultura, Desarrollo Rural, Medio Ambiente y Energía, Gobierno de Extremadura (SSA/SRCP-GobEx)*

Contacto: Javier Hermoso de Mendoza (jhermoso@unex.es)

### **Historia**

El grupo de Investigación de Patología Infecciosa de la Universidad de Extremadura PATIN-UEx, se constituyó oficialmente como tal dentro del Catálogo de Grupos de Investigación de la Universidad de Extremadura en 2007, aunque lleva más de dos décadas trabajando en la tuberculosis. Si bien inicialmente se centró en especies salvajes (Alonso et al. 1992), una de las principales preocupaciones del grupo fueron las repercusiones del problema en el ganado objeto de campañas de saneamiento, en otros reservorios domésticos de interés económico y el hombre (Tato 1999; Parra et al. 2003; 2005; Hermoso de Mendoza et al. 2006). En 1997 se obtuvo una subvención FEDER para trabajar en esta cuestión, seguida de proyectos nacionales y regionales en los que se iba completando el cuadro epidemiológico en la región y se establecían pautas para los trabajos posteriores. Parte de estos trabajos fueron financiados en convenios sucesivos con la Administración de Extremadura, Servicio de Sanidad Animal (SSA), especialmente la confirmación bacteriológica de animales sacrificados como positivos en las campañas de saneamiento de tuberculosis y brucelosis de rumiantes y el tipado molecular de los aislados del complejo *M. tuberculosis (spoligo)typing*, lo que se viene haciendo ininterrumpidamente desde 2004. Con estos convenios se ha comprobado que, además de a los bovinos, la tuberculosis afecta en nuestra región a jabalíes, ciervos y gamos entre las especies salvajes, y a cabras, ovejas y cerdos ibéricos entre las domésticas (Hermoso de Mendoza et al. 2006; Parra et al. 2006). Igualmente se han descrito casos de infecciones por *M. bovis* en humanos, pero a pesar de coincidir los espoligotipos con los de animales, en ningún caso ha sido posible hasta ahora una confirmación de vinculación directa con caza o ganadería. Con el

apoyo del SSA y ante la preocupación que la situación generaba en los sectores ganadero y cinegético, desde 2011 se involucró activamente el Servicio de Recursos Cinegéticos y Piscícolas (SRCP). Se hizo una búsqueda proactiva de reservorios salvajes incluyendo aves, carnívoros, mustélidos y roedores, hallándose tan solo un caso de tuberculosis en tejón, en una finca con alta prevalencia en ungulados salvajes. De este modo, respecto a la tuberculosis en Extremadura, el tándem UEX-PATIN/SSA/SRCP constituye un equipo que diseña y prueba medidas en el campo con el foco puesto simultáneamente en el control de la tuberculosis salvaje y su erradicación en los bovinos y el resto de los reservorios domésticos, y luego define y consensúa estrategias para aplicarlas en las fincas cinegéticas y explotaciones ganaderas, mediante campañas de concienciación, reglamentaciones específicas, etc.

### **Actualidad**

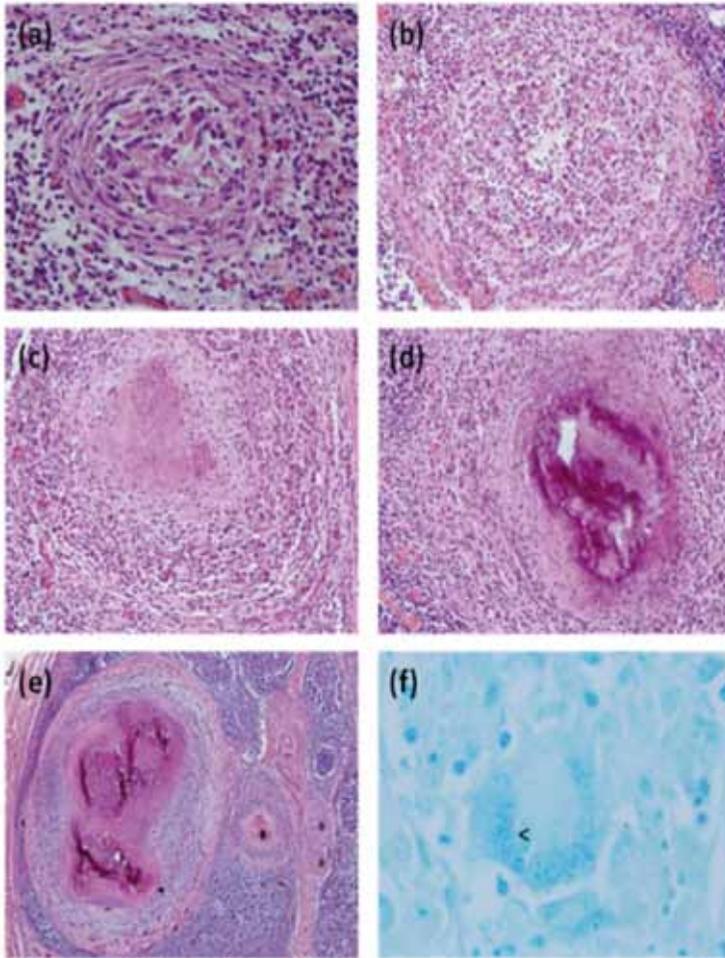
Hubo una serie de estudios descriptivos iniciales (Tato 1999; Parra et al. 2003; 2005; 2006; Hermoso de Mendoza et al. 2006) que pretendían: i) confirmar el hecho del problema de la tuberculosis firmemente establecido en las poblaciones de ungulados salvajes de Extremadura y cómo se ha podido llegar a esa situación; ii) mostrar que está estrechamente conectado a la tuberculosis en la ganadería bovina, así como a otras especies domésticas que actúan o pueden actuar como reservorio, en especial cabras y cerdos, y con menor relevancia en ovinos; iii) evidenciar la evolución temporal de la prevalencia y los factores que la pueden estar influyendo; y iv) señalar los reservorios más relevantes, es decir el papel predominante del jabalí y, un tanto más secundario, el de los rumiantes salvajes. A partir de estos trabajos hemos derivado a la búsqueda de soluciones al problema, que viene siendo nuestra ocupación actual.



**Figura 1.** Los manejos artificiales de los ungulados salvajes han favorecido la aparición de prevalencias elevadas de tuberculosis en estas especies. Si a la situación actual se ha llegado por cambios empíricos en el manejo y la gestión de ungulados salvajes con la finalidad de rentabilizar al máximo el recurso cinegético, pero que han tenido imprevistas y profundas repercusiones negativas, el efecto de estas podría paliarse, corregirse e incluso manipularse a voluntad con las adecuadas medidas de manejo correctoras. (Foto: PATIN-UEX)

## Futuro

La simplicidad del planteamiento no entraña que las medidas necesarias sean fáciles de identificar ni fáciles de aplicar. En este grupo se diseñan medidas para aplicar en las poblaciones salvajes y medidas específicas para aplicar en las especies domésticas, especialmente el ganado bovino (Parra et al. 2008), pero sin olvidar las otras. Destaca la definición del estadio lesional (Figura 2) en la valoración del riesgo epidemiológico en una finca o área determinada (García-Jiménez et al. 2012; 2013a; 2013c).



**Figura 2.** Estadios lesionales de tuberculosis. (a) Granuloma en estadio I. (b) Granuloma en estadio II. (c) Granuloma en estadio III. (d) Granuloma en estadio IV. (e) Granuloma en estadio IV con granulomas satélites. (f) Célula gigante multinucleada con un bacilo en su interior (ZN). (Foto: PATIN-UJEX)

Esta herramienta ayuda a hacer una primera estimación de la gravedad de la situación y junto con los datos epidemiológicos de campo se pueden decidir las medidas necesarias, que podemos agrupar en dos grandes bloques:

- Medidas que reduzcan o impidan el contacto entre animales, dificultando o impidiendo los contagios.
- Pueden ser tan genéricas como vallados de exclusión en áreas cinegéticas y en áreas ganaderas, en torno a bebederos o charcas:
  - dispersión de alimento para suplementación en grandes franjas de terreno, para evitar agregaciones (Castillo et al. 2011).
  - reducción de las poblaciones de jabalí para reducir riesgos de contagio (García-Jiménez et al. 2013b).
- O más específicas, como diseños de comederos exclusivos de especie (Figura 3), y de alimentos o mezclas atrayentes para cada especie (Fernández-Llario et al. 2010; Cerrato et al. 2012).



**Figura 3.** Ejemplos de comederos. (A) Comedero selectivo rayones. (B) Comedero selectivo jabalíes. (C) Comedero selectivo cérvidos. (D) Comedero selectivo corzos. (Fotos: PATIN-UJEX)

- Medidas que mejoren el estatus inmunitario de las poblaciones, reduciendo el riesgo de contagio desde los infectados, haciendo más resistentes a los indemnes, y en el caso de los bovinos, potenciando su reactividad a las pruebas diagnósticas oficiales, con lo que mejoraría la eficacia de los saneamientos.

- Pueden ser genéricas, las más interesantes:
  - combatiendo el efecto inmunosupresor de ciertos virus, como PCV2 y Aujeszky en jabalíes (Risco et al. 2013; 2014), y DVB e IBR en rumiantes domésticos y salvajes; y el de parásitos como vermes pulmonares en todas las especies (Risco et al. 2014). Nuestra hipótesis es que en poblaciones afectadas, la prevención de estos procesos mejoraría drásticamente las respuestas a la tuberculosis.
  - combatiendo la malnutrición, un mal crónico en todo el centro, sur y oeste peninsular, que afecta primordialmente a la función reproductora y a la inmunidad, especialmente en fincas ganaderas o cinegéticas donde no se suplementa o solo se hace con piensos de mantenimiento o a base de alimento monocereal, especialmente con maíz, extremadamente pobre en todo lo que no sean carbohidratos. Se ignora mayoritariamente que el suelo carece de niveles suficientes de calcio, lo que genera plantas, especialmente leguminosas, pobres en este elemento y pobres en proteínas, esenciales para la construcción de anticuerpos y de muchos mediadores de la inmunidad celular. Además la falta de calcio en el suelo motiva mayor demanda y gasto de Vitamina D<sub>3</sub>, esencial para activar a los macrófagos, mecanismo necesario para la destrucción de los bacilos tuberculosos fagocitados. Los niveles sanguíneos de esta vitamina en poblaciones naturales no suplementadas, tanto domésticas como silvestres rondan el raquitismo, lo que contradice la creencia, por otra parte no contrastada, de que en áreas de alta exposición solar anual, como puede ser Extremadura, no debería faltar vitamina D<sub>3</sub> en los animales. Sin embargo, es evidente que los precursores de esta vitamina tampoco están tan fácilmente disponibles para los animales en condiciones naturales. Nuestra hipótesis es que corregir estas carencias mediante enriquecimiento de suelos con calcio, siembras de leguminosas, y administración de correctores vitamínico minerales, puede dar un vuelco radical a situaciones de alta prevalencia de tuberculosis en salvajes y contribuir a la limpieza rápida de explotaciones bovinas positivas.
  - Pueden ser específicas, como el ensayo de vacunas antituberculosas, preferentemente inactivadas dadas las condiciones presumiblemente generalizadas de inmunosupresión, en poblaciones controladas de jabalíes y ciervos, y en fincas abiertas.

## Resumen

Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB			
Campo	Resultado	Aplicación	Referencia
Epidemiología	Descripción de casos de TB en jabalíes de Villuercas y Monfragüe	Primera descripción de TB en ungulados salvajes de Extremadura	Alonso et al. 1992
Epidemiología	Jabalí en primer lugar, rumiantes salvajes mucho más secundariamente, cerdo doméstico, y cabras son los principales reservorios de TB en Extremadura. La infección circula de forma fluida entre ellos y los bovinos objeto de saneamiento	Identificación de riesgos epidemiológicos, y llamada de atención a los responsables sobre la necesidad de controlar simultáneamente en todos los reservorios	Alonso et al. 1992; Tato 1999; Parra et al. 2000; 2003; 2005; 2006; Hermoso de Mendoza et al. 2006
Diagnóstico	Desarrollo de un protocolo de PCR en tiempo real para diagnóstico de TB en tejidos	Aplicación de PCR en tiempo real para la vigilancia epidemiológica de la TB en matadero	Parra et al. 2008
Diagnóstico	Desarrollo de escalas de evaluación lesional en TB de jabalíes y cérvidos	Diagnóstico asertivo de TB y evaluación del riesgo epidemiológico de transmisión de la enfermedad en función del tipo lesional	García-Jiménez et al. 2012; 2013a; 2013c
Control	Reducción de prevalencias de TB por dispersión del alimento suplementado	Ayuda al control de la TB salvaje reduciendo los riesgos de contagio	Castillo et al. 2011
Control	Reducción drástica de las poblaciones de jabalí	Medida que ayuda a reducir riesgos de contagio entre las poblaciones simpátricas, aunque no basta por sí sola	García-Jiménez et al. 2013b
Control	Diseño de comederos exclusivos de especie, y de alimentos o mezclas atrayentes para cada especie	Medidas que ayudan a reducir riesgos de contagio entre las poblaciones simpátricas, aunque no basta por sí sola	Fernández-Llario et al. 2010; Cerrato et al. 2012
Control	Demostración del efecto agravante de la TB de agentes inmunosupresores del jabalí: PCV2, ADV y <i>Mestastromylos</i> spp.	Potencial del control de procesos inmunosupresores concomitantes como adyuvante para el control de la TB salvaje	Risco et al. 2013; 2014

## 13. DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS ANIMAL

---

**Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET).  
Universidad Complutense de Madrid**

Contacto: Javier Bezos Garrido (jbezosga@visavet.ucm.es,  
bromero@visavet.ucm.es, dejuan@visavet.ucm.es)

### **Historia**

El Servicio de Micobacterias del Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) de la Universidad Complutense y actual Laboratorio Europeo de Referencia (EU-RL) de Tuberculosis Bovina posee una larga trayectoria en el desarrollo, puesta a punto, mejora y evaluación de las técnicas diagnósticas de tuberculosis en ganado bovino y otras especies domésticas, caprino principalmente, y salvajes. En este sentido, la mayor parte de los estudios realizados hasta la fecha por el grupo de investigación han ido dirigidos a la evaluación de la sensibilidad y especificidad de las técnicas diagnósticas oficiales *ante-mortem* en ganado bovino, intradermotuberculinización (IDTB) simple y comparada y prueba de detección de gamma-interferón ( $\gamma$ -IFN), en diferentes condiciones epidemiológicas (Álvarez et al. 2012, Tabla 1). La inclusión en el año 2006 de la técnica de detección de  $\gamma$ -IFN como prueba complementaria a la IDTB en el Programa de Erradicación de Tuberculosis Bovina de España con el objetivo de maximizar la detección de animales infectados supuso un gran avance, especialmente en lo referente a acortar la duración de los brotes y en la detección de animales recientemente infectados. La interpretación en paralelo de ambas pruebas supuso la forma más adecuada de aplicación con objeto de incrementar la sensibilidad, como se ha demostrado en numerosos estudios, algunos de ellos realizados por investigadores de VISAVET (Bezós et al. 2014a). Otro factor ampliamente discutido son las interferencias diagnósticas ocasionadas por micobacterias no tuberculosas, principalmente aquellas incluidas en el complejo *Mycobacterium avium* y especialmente *M. avium* subsp. *avium* y *M. avium* subsp. *paratuberculosis* o de bacterias filogenéticamente relacionadas, como *Corynebacterium pseudotuberculosis*, cuya prevalencia en algunos rebaños caprinos es muy alta. En rebaños libres de tuberculosis se ha podido demostrar que la prueba IDTB comparada es la prueba oficial más específica y que permite la diferenciación de estas infecciones por bacterias no tuberculosas, objetivo fundamental por el cual se desarrolló

esta técnica. La principal problemática deriva de la co-infección tuberculosis-paratuberculosis en un mismo rebaño, pues estudios realizados por VISAVET tanto con ganado bovino como caprino han demostrado un rendimiento menor de las pruebas diagnósticas en estas situaciones, poniendo de relieve la necesidad de emplear criterios más severos con objeto de incrementar la sensibilidad en estas situaciones de co-infección (Álvarez et al. 2008; 2009).

**Tabla 1.** Valores de sensibilidad y especificidad e intervalos de confianza de las pruebas diagnósticas de tuberculosis bovina obtenidos mediante un análisis Bayesiano (sin el empleo de los resultados de cultivo bacteriológico) a partir de datos de 6202 animales de una región de alta prevalencia. Las estimaciones previas fueron calculadas en base a los resultados de estudios previamente publicados. Los resultados completos fueron publicados y pueden ser consultados (Álvarez et al. 2012).

Interpretación/ punto de corte	IDTB simple		Prueba de $\gamma$ -IFN		
	Sensibilidad	Especificidad	Sensibilidad	Especificidad	Prevalencia
<b>Estimaciones previas</b>					
Interpretación severa	83.9 (>60)	95 (>75)	92 (>80)	90 (>80)	10 (<20)
Interpretación estándar	73.9 (>50)	98 (>82)	85 (>75)	98 (>90)	
<b>Estimaciones posteriores</b>					
IDTB simple severa					
Prueba de $\gamma$ -IFN 0.05	69.4 (40.1-92.2)	99.4 (98.7- 99.9)	89.3 (77.5-97.2)	85.7 (84.4-87.6)	2.59 (1.48-4.84)
Prueba de $\gamma$ -IFN 0.1	66.1 (35.3-91.3)	99.3 (98.6- 99.8)	83.1 (71.9-91.4)	90.3 (89.1-92.5)	2.52 (1.38-5.17)
IDTB estándar					
Prueba de $\gamma$ -IFN 0.05	56.6 (29.2-83.2)	99.7 (99.1-100)	90 (78.9-96.7)	85.7 (84.3-88)	2.58 (1.48-5.04)
Prueba de $\gamma$ -IFN 0.1	53 (27.3-81.5)	99.6 (99-100)	83.5 (73.6-91.6)	90.4 (89.1-92.7)	2.71 (1.38-5.48)

## Actualidad

En lo relativo a diagnóstico, los aspectos sobre los que investiga actualmente VISAVET/EU-RL se pueden resumir en:

### Diagnóstico *ante-mortem*

#### - Intradermotuberculinización

Aunque es una prueba relativamente sencilla de ejecutar, existen factores que pueden afectar de manera significativa a los resultados de la IDTB cuando se emplea en la campaña de saneamiento. Dentro de los factores relacionados directamente con la técnica que pueden afectar a su rendimiento cabe destacar: (1) potencia de la tuberculina (PPD) empleada, (2) conservación adecuada de la tuberculina, (3) correcta

utilización de material (pistola de inoculación y cutímetro) o (4) correcta interpretación de los signos clínicos en el punto de inoculación. Aparte, se han identificado factores relacionados con el animal que también pueden tener un efecto sobre los resultados, como son entre otros: (1) fase de infección, (2) aptitud o (3) presencia de infecciones concomitantes.

El EU-RL lleva trabajando desde el año 2008 en la evaluación de la potencia de las tuberculinas empleadas en Europa en las campañas de erradicación con el objetivo de asegurar que cumplen los criterios exigidos por la OIE y la Farmacopea Europea y que, por tanto, los resultados de las pruebas diagnósticas oficiales son fiables. Estas pruebas se realizan en cobaya y ganado bovino (Figura 1). El empleo de tuberculinas con una potencia por debajo de los límites recomendables puede impedir un correcto diagnóstico de los animales tuberculosos. El efecto de esos otros factores comentados anteriormente sobre los resultados de la IDTB también es valorado por el EU-RL, demostrándose que la IDTB es una técnica muy sensible a alteraciones del protocolo y dependiente del estatus de los animales.

Además, con objeto de mejorar la especificidad de la IDTB, se han desarrollado diferentes antígenos (proteínas recombinantes y péptidos sintéticos) que en combinación pueden incrementar la especificidad aunque, hasta la fecha, en detrimento de la sensibilidad en comparación con las PPDs. Aunque estas mezclas han sido empleadas principalmente en la prueba de  $\gamma$ -IFN, antígenos como ESAT-6, CFP-10 o Rv3615c también han sido empleados por VISAVET en la IDTB en ganado bovino y caprino (Casal et al. 2012). Siguiendo con esta línea de trabajo, se está colaborando con el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) en el desarrollo de nuevos antígenos con fines diagnósticos.



**Figura 1.** Pruebas de determinación de la potencia de las tuberculinas empleadas en las campañas de erradicación en Europa, realizadas por el Laboratorio Europeo de Referencia (EU-RL) de Tuberculosis Bovina tanto en cobaya como en ganado bovino. (Fotos: VISAVET)

#### - Prueba de detección de $\gamma$ -IFN

VISAVET/EU-RL desarrolla numerosos estudios para evaluar la sensibilidad y especificidad de diferentes pruebas comerciales de detección de  $\gamma$ -IFN en diferentes condiciones epidemiológicas y valorar su utilidad como prueba complementaria en los programas de

erradicación. Asimismo, investiga el efecto que pueden tener alteraciones del protocolo, principalmente en la fase que incluye desde la recogida de muestras en la explotación hasta su estimulación en el laboratorio. Dentro de estos factores, la temperatura de conservación y el tiempo transcurrido antes de la estimulación resultan críticos, como se ha demostrado en estudios previos (Bezós et al. 2011). El protocolo de realización de la prueba y su interpretación puede diferir entre países, afectando a los resultados de la prueba, como han demostrado estudios realizados por el EU-RL. Este hecho, ha impulsado a la Comisión Europea a promover la armonización de la técnica, tarea en la que está involucrada directamente el EU-RL.

El empleo de antígenos alternativos más específicos que las PPDs con objeto de incrementar la especificidad de la técnica de detección de  $\gamma$ -IFN también es objeto de estudio, al igual que en la IDTB habiéndose detectado una mayor especificidad de estas mezclas antigénicas en detrimento de cierta sensibilidad.

#### - Serología

VISAVET trabaja en el desarrollo y evaluación de la especificidad y sensibilidad de diferentes técnicas de base humoral para el diagnóstico de la tuberculosis en animales domésticos y salvajes. Estas técnicas son, en principio, muy específicas pero menos sensibles que las técnicas de base celular. Se han evaluado diferentes pruebas comerciales y se ha participado en el desarrollo de algunas en fase experimental, como el DR-ELISA desarrollado por la empresa Ingenasa (Madrid, España), que ha mostrado resultados prometedores (Bezós et al. 2013; 2014c) y otra en colaboración con el ISCIII basada en nuevos antígenos que se están desarrollando. En estos estudios se ha puesto de manifiesto que la sensibilidad de las técnicas serológicas mejora cuando se emplean sueros recogidos 15-30 días después de la realización de la IDTB, aprovechando la estimulación específica (efecto *booster*) que produce la inoculación previa de las PPDs sobre la respuesta humoral (Casal et al. 2014).

#### **Diagnóstico *post-mortem***

El cultivo bacteriológico y posterior caracterización molecular de los aislados sigue siendo la técnica de referencia para el diagnóstico de la tuberculosis bovina. Uno de los principales problemas que plantea es su sensibilidad variable, especialmente cuando se parte de muestras sin lesiones tuberculosas y el lento crecimiento de las micobacterias, que retrasa el diagnóstico y la toma de decisiones y, por tanto, impide una erradicación de los brotes más rápida. En este sentido VISAVET/EU-RL trabaja en técnicas de extracción directa de ADN a partir de muestras de tejido con el objetivo de minimizar este problema, al permitir un diagnóstico precoz a la espera de la confirmación mediante cultivo bacteriológico. Se han probado diferentes kits comerciales para determinar su sensibilidad y especificidad en relación al cultivo, mostrando que puede ser una buena opción diagnóstica en el futuro al mostrar en el mejor de los casos una sensibilidad y una especificidad en relación al cultivo de entorno al 95%.

## **Futuro**

Entre las actividades de investigación relacionadas con el diagnóstico en las que VISAVET/EU-RL prevé seguir trabajando son:

- Evaluación de la sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas oficiales de tuberculosis de base celular (IDTB y detección de  $\gamma$ -IFN) en ganado bovino y caprino en diferentes condiciones epidemiológicas.
- Evaluación de la sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas de tuberculosis de base humoral disponibles actualmente y efecto de su aplicación conjuntamente con las pruebas de base celular en el proceso de erradicación.
- Desarrollo de nuevos antígenos en colaboración con el Servicio de Inmunología del Instituto de Salud Carlos III para la mejora en términos de sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas actuales de base celular, el desarrollo de nuevas plataformas de diagnóstico de tuberculosis de base humoral y la diferenciación de animales vacunados de infectados.
- Determinación de la potencia de las tuberculinas en cobayas y ganado bovino y caprino y evaluación de su efecto sobre los resultados de las pruebas diagnósticas.
- Evaluación de los factores críticos que pueden afectar a la prueba IDTB y a la técnica de detección de  $\gamma$ -IFN y armonización del protocolo de esta última en los diferentes países.
- Validación de la técnica de extracción directa de ADN a partir de tejido como alternativa al cultivo bacteriológico.

## **Resumen**

(ver resumen integrado al final del capítulo 16)



## 14. HERRAMIENTAS EPIDEMIOLÓGICAS PARA CONTROLAR LA TUBERCULOSIS BOVINA

**Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET).  
Universidad Complutense de Madrid**

Contacto: Beatriz Romero Martínez (bromero@visavet.ucm.es,  
jbezosga@visavet.ucm.es, dejuan@visavet.ucm.es)

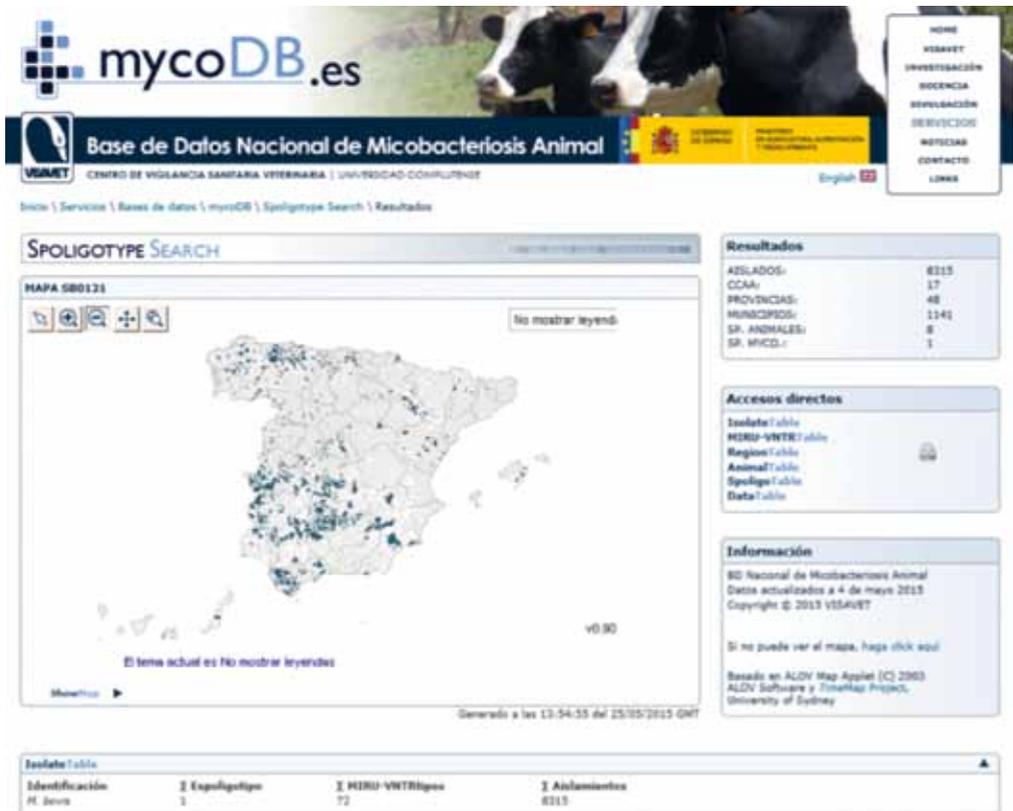
### Historia

El Servicio de Micobacterias del Centro de Vigilancia Sanitaria Veterinaria (VISAVET) de la Universidad Complutense de Madrid y actual Laboratorio Europeo de Referencia (EU-RL) de tuberculosis bovina posee una larga trayectoria en la realización de estudios epidemiológicos, principalmente de base molecular.

En España, la caracterización molecular de los miembros del complejo *M. tuberculosis* (CMT) se basa principalmente en los polimorfismos encontrados en el locus DR (*direct repeat*), que contiene un número variable de repeticiones cortas intercaladas con espaciadores o secuencias no repetidas. Este método se denomina espoligotipado o *spoligotyping* (Kamerbeek et al. 1997). Además, esta técnica permite la diferenciación de las especies *Mycobacterium bovis*, *M. caprae* y *M. tuberculosis*, principales agentes causales de la tuberculosis en vacas, cabras y humanos, respectivamente. En España no se puso de manifiesto el alto grado de diversidad genética de los aislados de *M. bovis* de origen animal hasta el año 2010 ( $D=0,87$ ) (Rodríguez et al. 2010), en el que un total de 6.215 aislados de *M. bovis* se agruparon en 252 espoligotipos con variaciones en la frecuencia, distribución geográfica y aparición en distintas especies animales. El 77% de los aislados se agruparon en 15 espoligotipos y los cinco más frecuentes fueron SBo121 (27,94%), SBo134 (11,21%), SBo339 (8,06%), SBo265 (6,31%) y SBo295 (4,10%). *Mycobacterium caprae* fue elevada a especie perteneciente a CMT en el año 2003 (Aranaz et al. 2003) y la discriminación de 791 aislados fue inferior a la de *M. bovis* ( $D=0,58$ ), agrupándose en un total de 15 perfiles, siendo el perfil más frecuente el SBo157 (Rodríguez et al. 2011). De aquí hay que destacar que el 38,1% de los brotes tenía relación con cabras, observando una tendencia en aumento de los casos de tuberculosis en vacas causada por *M. caprae*.

En aquellos casos en los que el espoligotipado no aporta suficiente discriminación se recomienda el uso de la técnica basada en el número variable de repeticiones en tándem (VNTR) que diferencia las repeticiones de varios minisatélites localizados en el genoma (Frothingam y Meeker-O'Connell 1998). La discriminación de esta técnica se ha puesto de manifiesto en varios estudios a nivel nacional e internacional siendo el más notable el que diferencia 115 aislados incluidos en el espoligotipo SBO121 en 51 ó 65 VNTRtipos, dependiendo del uso de 4 (QUB3232, ETR-A, ETR-B y QUB11a) ó 6 marcadores (ETR-A, ETR-B, ETR-D, ETR-E, MIRU26, QUB11a, QUB11b, QUB26 y QUB3232) genéticos (Rodríguez-Campos et al. 2013).

En el año 2008, en colaboración con el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medioambiente, el Centro VISAVET creó mycoDB.es (Figura 1), una base de datos que recoge todos los registros nacionales de micobacteriosis animal causada por las bacterias del CMT desde 1996 hasta la actualidad (Rodríguez-Campos et al. 2012a).



**Figura 1.** Búsqueda por espoligotipos en la base de datos mycoDB.es. La información mínima que se requiere para incluir en esta base de datos es la especie animal de la que procede el aislado, la localización geográfica a nivel de municipio, la identificación de la micobacteria y el espoligotipo. La base de datos se complementa con un visor que muestra la distribución geográfica de los aislamientos de micobacterias según los criterios de consulta seleccionados. Fuente: VISAVET.

El uso de las herramientas moleculares y, principalmente, el estudio de la pérdida de espaciadores en el locus DR, proporciona información adicional acerca de la evolución de los miembros de CMT (Romero et al. 2008) o de la existencia de linajes o complejos clonales. Hasta el momento se han descrito cuatro linajes para *M. bovis* (Af1, Af2, EU1 y EU2) (Rodríguez-Campos et al. 2012b; Smith 2012), con la participación del Centro VISAVET en tres de ellos. El complejo denominado European 2 (EU2) define a los aislados de *M. bovis* españoles (66%), portugueses (74%) y de forma más moderada franceses (20,4%).

## Actualidad

El progreso en la erradicación y control de la tuberculosis bovina no es uniforme debido al efecto de varios factores epidemiológicos que impiden el éxito de los programas de erradicación. En la actualidad el Centro VISAVET no sólo usa las técnicas moleculares sino que también estudia los factores que condicionan las dinámicas de transmisión de la enfermedad mediante la aplicación de distintas aproximaciones analíticas (de la Cruz et al. 2014).

En lo relativo a la epidemiología de esta enfermedad, los aspectos sobre los que investiga actualmente el Centro VISAVET se pueden resumir en:

- Evaluación del impacto que los factores ambientales, de manejo y asociados al hospedador y al patógeno tienen en el desencadenamiento de la enfermedad y su posterior evolución a nivel de explotación, mediante el análisis de los datos generados de manera rutinaria en las campañas de erradicación de tuberculosis bovina.

- Gestión de la base de datos mycoDB.es, que incluye un estudio anual de los espilogotipos y comparación de la distribución y prevalencia de los espilogotipos más frecuentes en España por Comunidades Autónomas y Provincias (Tabla 1).

- Uso de los VNTRs como método de discriminación de los espilogotipos más frecuentes y asociación de brotes en distintas explotaciones.

**Tabla 1.** Espilogotipos identificados desde 2008 hasta 2013 y frecuencias de aparición.

España	2008	2009	2010	2011	2012	2013
N Perfiles	155	151	131	142	112	110
Espilogotipos frecuentes (%)	SB0121 (28,03%)	SB0121 (27,89%)	SB0121 (27,07%)	SB0121 (29,26%)	SB0121 (26,38%)	SB0121 (28,31%)
	SB0134 (10,20%)	SB0134 (9,8%)	SB0134 (12,93%)	SB0134 (8,77%)	SB0134 (11,24%)	SB0134 (11,52%)
	SB0339 (6,55%)	SB0295 (7,33%)	SB0295 (8,86%)	SB0339 (6,81%)	SB0295 (7,62%)	SB0295 (8,50%)
	SB0130 (5,72%)	SB0339 (5,34%)	SB0339 (6,26%)	SB0295 (5,75%)	SB0339 (5,90%)	SB0339 (5,71%)
	SB0265 (4,81%)	SB0265 (4,46%)	SB0152 (5,12%)	SB0265 (4,35%)	SB0120 (5,05%)	SB0120 (3,66%)
Huérfanos	84	80	62	67	58	53

## **Futuro**

Entre las actividades de investigación relacionadas con la epidemiología en las que el Centro VISAVET prevé seguir trabajando están:

- Evaluar el impacto que distintos factores relacionados tanto con el hospedador como con el patógeno tienen para la evolución de la enfermedad y su efecto en las campañas de erradicación de la tuberculosis bovina. La combinación de la información generada mediante estos análisis con la obtenida mediante la aplicación de técnicas de caracterización molecular realizadas sobre los agentes causales de los brotes puede permitir la determinación de la direccionalidad de la transmisión entre explotaciones.

- Secuenciación masiva de las cepas más prevalentes en España para estudiar la correlación entre los genotipos existentes (espoligotipos y mirutipos) y su patogenia y/o virulencia.

- Coordinación y manejo de la base de datos internacional Mbovis.org que genera los espoligotipos en el marco del EU-RL.

- mycoDB.es, evolución de los genotipos desde el año 2009 hasta la actualidad con la colaboración de todos los laboratorios que reportan datos a la misma y el MAGRAMA.

- Implementación de las técnicas de caracterización molecular para el material genético extraído directamente de la muestra.

## **Resumen**

(ver resumen integrado al final del capítulo 16)

## 15. PROGRAMA DE ERRADICACIÓN DE LA TUBERCULOSIS CAPRINA EN CASTILLA Y LEÓN

*Servicio de Sanidad Animal. Dirección General de Producción Agropecuaria y Desarrollo Rural. Consejería de Agricultura y Ganadería. Junta de Castilla y León/VISAVET*

Contacto: Olga Mínguez (mingonol@jcyl.es)

### **Historia**

*Línea de investigación tuberculosis caprina en el Programa Epidemiológico Transfronterizo entre España y Portugal de investigación de las zoonosis (Proyecto 0441\_ZOONOSIS\_2\_E) el marco del programa operativo transfronterizo España-Portugal.*

Conscientes de que la lucha contra la tuberculosis animal, entendida como una única entidad, debe abordarse desde un punto de vista integral, Castilla y León desarrolló ya en el año 2002 mediante la Orden de 29 de abril de 2002 de la Consejería de Agricultura y Ganadería, las primeras pautas de actuación frente a esta enfermedad en la especie caprina.

Durante los primeros años (2002-2008) de implantación de dicha Orden, en la que se establecen las normas que han de regular la ejecución de la campaña de saneamiento ganadero para la erradicación de la tuberculosis caprina en Castilla y León, se realizaron una serie de controles y estudios. Éstos pusieron de manifiesto el papel que el ganado caprino (Figura 1) podía jugar en la epidemiología de esta enfermedad y su posible importancia en la difusión de la tuberculosis a otras especies, principalmente a la especie bovina, así como su potencial como fuente de infección también para el hombre.



**Figura 1.** Rebaño caprino. (Foto: Junta de Castilla y León)

Si bien la importancia de las cabras como fuente de contagio a la especie humana puede ser relativa en cuanto al número de casos, podría tener gran importancia debido a la gravedad de la enfermedad. En nuestro país, se ha descrito que aproximadamente un 0,3% de la tuberculosis humana está producida directamente por cepas de *M. caprae*, siendo la cepa más frecuente en los casos de tuberculosis humana de origen caprino la cepa SBo157 (Rodríguez et al. 2009). Precisamente, esta cepa es la más frecuentemente aislada en el ganado caprino en Castilla y León. Se aportaron evidencias del riesgo que el ganado caprino puede constituir como foco de contagio para la especie bovina. Se demostró que en Castilla y León existía una gran correlación entre el censo de cabras existente y el número de aislamientos de tuberculosis de origen caprino (*M. caprae*) en el ganado bovino. Como muestra de lo anteriormente expuesto, en toda Castilla y León en el año 2008 el 3,4% de los aislamientos de tuberculosis en ganado bovino eran de origen caprino (Figura 2). En ese mismo año y en la provincia de Ávila (que concentra el 50% del censo caprino de la región) dicho porcentaje ascendía hasta un llamativo 18,8%.



**Figura 2.** Lesión tuberculosa en linfonodo en caprino. (Foto: Junta de Castilla y León)

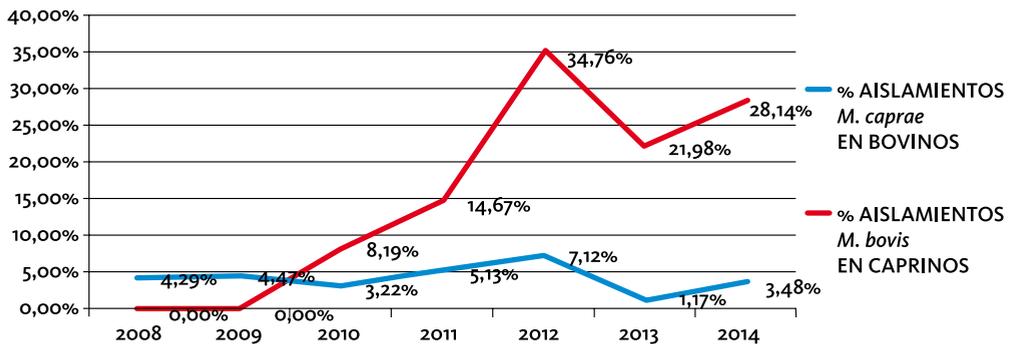
Dada la importancia que el ganado caprino podría tener en la transmisión de esta enfermedad al resto de especies en general, y a los bovinos en particular, además de las trabas que puede causar en la progresión de los programas de erradicación de la tuberculosis bovina, a partir del año 2008 se produce un espectacular incremento del número de explotaciones incluidas en el programa de erradicación de la tuberculosis caprina. El incremento en el número de explotaciones caprinas saneadas frente a la tuberculosis y el considerable número de animales infectados detectados en algunas explotaciones, hacen que en el año 2010 se publique una nueva modificación legislativa del programa oficial que pretende mejorar tanto el nivel de detección de la enfermedad como la calidad del diagnóstico, con vistas a seguir manteniendo los buenos resultados del programa de erradicación en un escenario de aumento continuado de las pruebas diagnósticas. La evolución del programa se ve claramente en el número de rebaños controlados, pasándose de 112 establos controlados en el año 2007 a 1.943 establos en el año 2013, lo que supone multiplicar por 17 el número de explotaciones examinadas, abarcando la práctica totalidad de la cabaña castellano y leonesa.

### **Actualidad**

Este incremento en el número de explotaciones incluidas en el programa de erradicación de la tuberculosis caprina ha permitido que en el año 2013 en Castilla y León se hayan realizado pruebas diagnósticas para la tuberculosis en más de 100.000 animales, lo que supone un 77,89% de los animales censados y un 97,39% de las explotaciones de caprino de la región.

En cuanto a la presencia de la tuberculosis en las cabras, la aplicación del programa de erradicación ha logrado hacerla disminuir desde valores aproximados del 10% (año 2007) a valores por debajo del 2% (año 2013).

En los últimos años, además, se observa el aumento de aislamiento de *M. bovis* en animales de la especie caprina, hecho a considerar en el contexto de los programas de erradicación en el ganado bovino dado que a medida que el programa de erradicación de la tuberculosis caprina avanza en Castilla y León queda de manifiesto que esta especie animal puede actuar también como reservorio de *M. bovis* (Figura 3).



**Figura 3.** Porcentaje de *Mycobacterium caprae* con respecto a aislamientos totales identificados en la cabaña bovina (en azul) por años y porcentaje de *Mycobacterium bovis* con respecto a aislamientos totales identificados en la cabaña caprina (en rojo). Aislamientos de Castilla y León. Estudio sobre 9438 muestras identificadas entre 2008 y 2014 (5823 aislamientos en bovino y 3615 aislamientos en caprino). Fuente: Junta de Castilla y León.

## Futuro

La prueba de la intradermotuberculinización comparada se ha utilizado durante los 12 primeros años de aplicación del programa, con el fin de evitar posible reacciones cruzadas con la infección por la micobacteria causante de la paratuberculosis (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*). No obstante, en rebaños donde coexisten ambas enfermedades, el estudio detallado del rendimiento de las pruebas diagnósticas ha demostrado que el uso de la intradermotuberculinización comparada provoca una disminución notable de la sensibilidad diagnóstica (Álvarez et al. 2008), lo que conlleva una menor eficacia del programa de erradicación, cuyo objetivo es eliminar el mayor número de animales infectados en el rebaño.

En Castilla y León, estudios realizados en rebaños de ganado caprino sometidos a vacío sanitario han arrojado valores de sensibilidad de la intradermotuberculinización comparada con interpretación severa de entre 8 y 60%, con un valor global del 21% (Bezós et al. 2014b). Esta sensibilidad se puede considerar bastante limitada para fundamentar en ella un programa de erradicación. La estimación de sensibilidad de la intradermotuberculinización simple (interpretación severa) en esas mismas condiciones osciló entre 20 y 88%, con un valor total del 44%. A partir de 2014 se ha optado por la aplicación de esta prueba diagnóstica.

El cambio de diagnóstico no ha supuesto un incremento significativo de la prevalencia a nivel de rebaño (Tabla 2), ni tampoco una disminución de la especificidad. En esta línea esperamos obtener la máxima información sobre el papel epidemiológico que el ganado caprino supone para la epidemiología de la cabaña de Castilla y León, así como avanzar en la obtención del máximo estatus sanitario posible en el ganado caprino regional.

**Tabla 2.** Actuaciones realizadas dentro del programa de erradicación de la tuberculosis caprina en Castilla y León. El uso de la intradermotuberculinización simple se ha establecido en 2014. Fuente: Junta de Castilla y León.

Año	Nº explotaciones investigadas	Nº cabras analizadas	Nº explotaciones positivas	Prevalencia
2007	112	21.283	12	10,71%
2008	139	26.991	16	11,51%
2009	232	37825	11	4,74%
2010	666	80.644	71	10,66%
2011	927	91.489	46	4,96%
2012	1808	89.426	34	1,88%
2013	1943	124.868	33	1,70%
2014	1907	133.239	37	1,94%

## Resumen

(ver resumen integrado al final del capítulo 16)



## **16. EVALUACIÓN DE LA RED DE MOVIMIENTOS DE GANADO BOVINO EN CASTILLA Y LEÓN PARA LA IDENTIFICACIÓN DE FACTORES ASOCIADOS CON LA TRANSMISIÓN DE TUBERCULOSIS BOVINA Y EL DESARROLLO DE HERRAMIENTAS DE TRAZABILIDAD EN EXPLOTACIONES INFECTADAS**

---

*Servicio de Sanidad Animal. Dirección General de Producción Agropecuaria y Desarrollo Rural. Consejería de Agricultura y Ganadería. Junta de Castilla y León/VISAVET*

Contacto: Olga Mínguez (mingonol@jcyl.es)

### **Historia**

A lo largo de las dos últimas décadas VISAVET adscrito a la Universidad Complutense de Madrid ha desarrollado una intensa labor investigadora en todos los aspectos relacionados con la tuberculosis. Estos trabajos se han desarrollado en múltiples campos temáticos y en la actualidad se centran en varias líneas relacionadas con el diagnóstico de la tuberculosis (optimización y puesta a punto de técnicas para el diagnóstico de la tuberculosis en ganado bovino y otras especies animales), epidemiología molecular de la tuberculosis (estudios epidemiológicos basados en los datos de caracterización molecular de miembros del complejo *M. tuberculosis*) y control de la enfermedad (investigación experimental y a nivel de campo de las vacunas existentes y de nuevo desarrollo para el control de la tuberculosis en animales domésticos y salvajes). Por otra parte desde la Administración Regional de la Junta de Castilla y León dada la gran importancia socioeconómica que representa el sector bovino autonómico, se ha potenciado la investigación relacionada con el diagnóstico, epidemiología y control de la enfermedad que permita la mejora del estatus sanitario de la cabaña ganadera regional. Así, se han enmarcado estos trabajos en el Programa Operativo Transfronterizo entre España y Portugal de investigación de las zoonosis (proyecto o441\_ZOONOSIS\_2\_E). En el año 2015 se han potenciado estos trabajos a través de una colaboración con el College of Veterinary Medicine (University of Minnesota).

## **Actualidad**

A pesar de la existencia de posibles reservorios de vida libre que puedan actuar como fuente de infección en países endémicos, el principal riesgo de introducción y persistencia de la enfermedad en las explotaciones de bovino sigue siendo el ganado (Figura 1), y por eso las estrategias de control y erradicación se dirigen fundamentalmente a la detección temprana de explotaciones infectadas, evitando a partir de ese momento que éstas puedan constituir un riesgo para otros rebaños mediante el control de sus movimientos. A pesar de ello, debido a las limitaciones de las técnicas diagnósticas existentes en la actualidad para la detección de animales tuberculosos, existe un riesgo de que se produzcan movimientos de animales potencialmente expuestos en explotaciones infectadas en las que todavía no se ha detectado la infección. Por ello, la caracterización de la red de movimientos de ganado a nivel regional constituye una herramienta de gran utilidad.



**Figura 1.** Imagen de ganado bovino extensivo: dehesa de Salamanca. (Foto: Junta de Castilla y León)

## **Futuro**

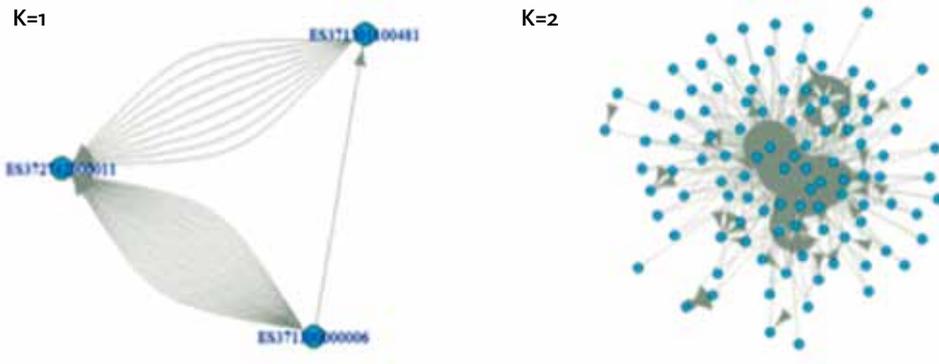
El trabajo se divide en varias líneas temáticas:

**Desarrollar herramientas para la identificación de las vías de entrada de la tuberculosis en las explotaciones de ganado bovino**

- Fauna silvestre
- Contacto entre granjas (bioseguridad)
- Persistencia (falta de sensibilidad de las pruebas)
- Movimientos

Dada la hipótesis de que los movimientos de animales (Figura 2) suponen un riesgo en el caso de tuberculosis bovina, se realizará el estudio de las redes de movimiento de ganado bovino en Castilla y León con el fin de identificar los patrones de movimientos de los animales en función de las distintas características de las explotaciones (censos, aptitudes, condiciones de manejo etc), lo que puede servir para la construcción de modelos de transmisión de la enfermedad destinados a predecir el riesgo en función de dichas características.

### Ejemplo: movimientos de una explotación positiva



**Figura 2.** Ejemplo de movimientos de una explotación positiva.

Por otra parte, el análisis de los datos de los últimos años también permitirá evaluar las diferencias existentes en los patrones de movimientos registrados en explotaciones infectadas (previamente a su detección) y no infectadas, lo que puede conducir a la detección de prácticas asociadas con un mayor riesgo de la enfermedad, así como a la rápida identificación de los contactos asociados a cada una de las explotaciones infectadas conectados a partir de movimientos interpuestos (Figura 3).



**Figura 3.** Ganadería de raza Morucha. (Foto: Junta de Castilla y León)

Toda esta información se utilizará para la realización de un análisis de redes sociales (Social Network Analysis) en los que las explotaciones serán los nodos y los movimientos los vértices, y que permitirá la consecución de los objetivos perseguidos (Tabla 1). La comparación de los patrones de movimientos de explotaciones infectadas y libres permitirá la detección de factores potencialmente asociados con los focos de enfermedad. La metodología desarrollada permitirá también desarrollar sistemas automatizados de análisis que permitan una rápida trazabilidad.

**Tabla 1.** Social network analysis: movimientos de ganado bovino en Castilla y León (Fuente: Junta de Castilla y León).

Aptitud	In-degree				Out-degree (sin movimientos a matadero/o SL)			
	Media	Mediana	Desv est	Máx	Media	Mediana	Desv est	Máx
Carne	1.2	0	2.5	63	7.1 (4)	6 (3)	6.86 (4.4)	125 (105)
Leche	0.82	0	2.5	44	13.9 (8.8)	11 (6)	13.2 (9.5)	119 (70)
Lidia	3.6	1	7.3	60	11.6 (8.5)	8 (5.5)	12.3 (10.6)	85 (81)
Cebadero	12.3	4	33.1	928	13.3 (0.6)	5 (0)	24.0 (9.2)	448 (444)
Mixta	1	0	2.8	44	8.2 (4.4)	6 (2)	8.7 (6.0)	72 (64)

## RESUMEN INTEGRADO VISAVET Y JUNTA DE CASTILLA Y LEÓN (Resúmenes 13, 14, 15 y 16)

Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB			
Campo	Resultado	Aplicación	Referencia
Diagnóstico	Co-infección de TB y paratuberculosis disminuye la sensibilidad de pruebas diagnósticas	Mejora del diagnóstico de TB en rebaños con TB y paratuberculosis	Álvarez et al. 2008; 2009; Bezos et al. 2010
Diagnóstico	La prueba IDTB simple se muestra como la interpretación más adecuada para el diagnóstico de TB caprina en regiones de alta prevalencia, recomendándose el empleo de $\gamma$ -IFN si es posible para maximizar la detección de animales infectados	Mejora de los programas de erradicación de TB en ganado caprino	Bezos et al. 2014b
Diagnóstico	En tiempo transcurrido entre la recogida de sangre y su estimulación en el laboratorio es un factor crítico en la prueba de detección de $\gamma$ -IFN	Mejora del rendimiento de la prueba de detección de $\gamma$ -IFN	Bezos et al. 2011; 2012
Diagnóstico	En alpacas, la combinación de la tuberculina simple en región axilar o cervical e interpretada a las 72 h con serología empleando sueros recogidos 15-30 días después de la IDTB maximiza la detección de animales con TB	Mejora del diagnóstico de TB en llamas y alpacas	Bezos et al. 2013; 2014c
Diagnóstico	El empleo de mezclas de péptidos y proteínas conteniendo ESAT-6, CFP-10 y Rv3615c tanto en la IDTB como en el $\gamma$ -IFN puede incrementar la especificidad de las pruebas aunque en detrimento de cierta sensibilidad	Mejorar el diagnóstico mediante IDTB y detección de $\gamma$ -IFN	Casal et al. 2012
Diagnóstico	Las técnicas serológicas muestran, en general, una elevada especificidad pero una sensibilidad variable en el diagnóstico de la TB bovina. Para mejorar la sensibilidad se recomienda el empleo de muestras recogidas tras la IDTB	Mejorar el diagnóstico de la TB mediante serología en ganado bovino	Casal et al. 2014

Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB			
Campo	Resultado	Aplicación	Referencia
Epidemiología	Espoligotipos más prevalentes en España en bovino y silvestres	Conocer la distribución y frecuencias de los aislados de CMT para trazar brotes	Rodríguez et al. 2010
Epidemiología	Localización de una zona de alto riesgo en la Comunidad de Madrid estimando la distancia para que se produzca la transmisión entre explotaciones	Identificación de los factores que permitan la aplicación de medidas de control específicas, y que proporcionen ideas sobre la transmisión de la enfermedad en combinación con las técnicas moleculares	de la Cruz et al. 2014
Epidemiología	Revisión de modelos epidemiológicos que ayuden en la toma de decisiones sobre los puntos críticos en los actuales programas de control	Mejora en los programas de erradicación que ayuden a demostrar la ausencia de infección o la detección temprana de la misma	Álvarez et al. 2014

## 17. IMPORTANCIA DE LA TUBERCULOSIS BOVINA EN HUMANOS: DESDE LOS DATOS EPIDEMIOLÓGICOS A LA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

---

**Grupo de Genética de Micobacterias de la Fundación IIS Aragón (Universidad de Zaragoza, IACS, Hospital Universitario Miguel Servet) y del CIBER de Enfermedades Respiratorias**

Contacto: Carlos Martín (jagonzal@unizar.es, ssamper.iacs@aragon.es, carlos@unizar.es; web: genmico.unizar.es)

### **Historia**

El Grupo, creado en 1992, ha sido pionero en genética de micobacterias en España y con una gran proyección internacional, desde su creación ha trabajado en colaboración con otros grupos de investigación, tanto nacionales como europeos y latinoamericanos. En concreto, en nuestros primeros estudios, en los años 90, colaboramos con grupos de veterinarios interesados en la tuberculosis del ganado ovino, caprino, y leones marinos, lo que supuso un acercamiento a *M. bovis*, *M. caprae* y *M. pinnipedii* (Gutiérrez et al. 1997; Zumárraga et al. 1999). Ya en los primeros análisis moleculares se pudieron analizar las diferencias fenotípicas entre ellos, como la resistencia natural a la pirazinamida de *M. bovis*, no presente en el resto de los miembros del complejo conferida por la mutación H57D del gen *pncA*. Y posteriormente, pudieron describirse los distintos patrones y marcadores genotípicos (Brosch et al. 2002).

El interés del grupo se plasma en la trascendencia de los proyectos de investigación en los que participa para la construcción racional de nuevos candidatos a vacuna contra la tuberculosis, que incluyen FP5 (2000-2003), FP6 (2004-2009), FP7 “New TB-VAC” (2010-2013) y actualmente dentro del Horizonte 2020 con el proyecto “TBVAC2020”. Desde 1998 el grupo coordina y realiza de forma sistemática el estudio genético de las cepas de *M. tuberculosis* multirresistentes y ha impulsado en colaboración con el Instituto de Salud Carlos III la creación de la Red de Laboratorios del Sistema Nacional de Salud para el estudio de la tuberculosis multirresistente en España. Desde el año 2001, en colaboración con el Departamento de Salud y Consumo del Gobierno de Aragón, realiza la caracterización molecular sistemática de las cepas de *M. tuberculosis* aisladas en Aragón.

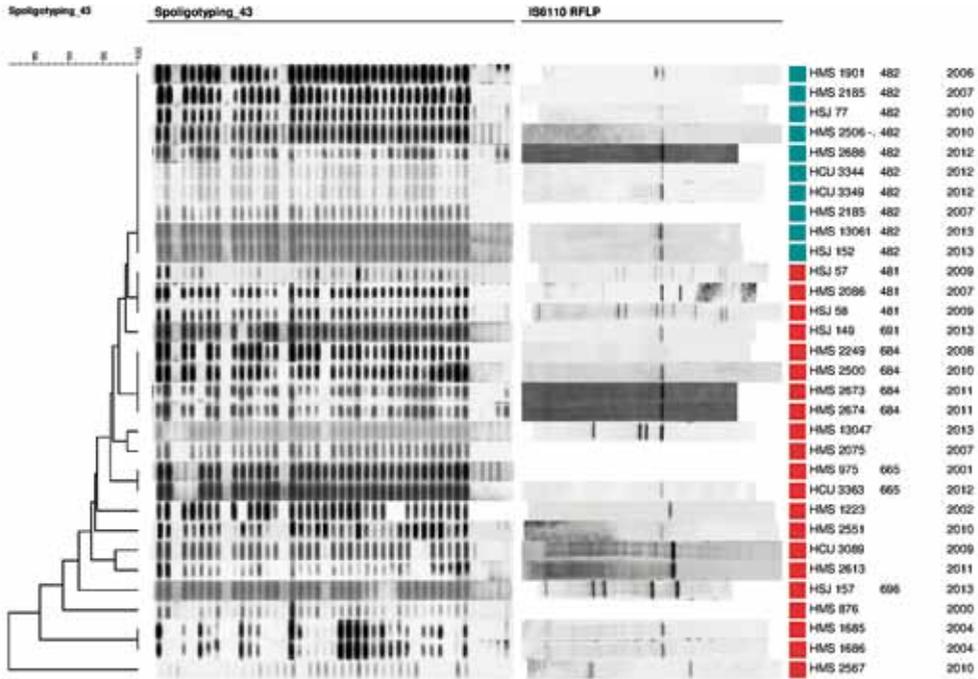
La incidencia anual de casos tuberculosis humana producida por *M. bovis* ha disminuido considerablemente debido a las campañas de erradicación en animales. Se estima que en la mayoría de los países industrializados, los casos producidos por *M. bovis* representan menos del 1% del total de casos de tuberculosis en humanos. Por otro lado la transmisión persona-persona del *M. bovis* ha sido fuente de controversia, existiendo la acepción general de que es poco frecuente. Sin embargo esta transmisión es posible, incluso para cepas resistentes. En nuestro país, se describió la transmisión nosocomial de *M. bovis* extremadamente-resistente principalmente entre personas VIH positivas en distintos países, con una gran letalidad (Samper et al. 1997).

La importancia que en nuestro país presenta la tuberculosis asociada a *M. bovis* y *M. caprae* se estudió para los años 2004 a 2007. Estas cepas representaban el 1,9% y el 0,3% respectivamente de los aislamientos del complejo *M. tuberculosis* (CMT) disponibles en el Laboratorio Nacional de referencia del Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III en Madrid. El análisis de las cepas mediante *spoligotyping* mostró 30 patrones diferentes, siendo SBo121, SBo134 y SBo157 los predominantes, y concluye que un porcentaje destacable de los mismos estaban ligados a la exposición ocupacional y a la procedencia de países endémicos para la tuberculosis bovina (Rodríguez et al. 2009).

Los esfuerzos realizados en las últimas décadas en el campo de la genómica de micobacterias han proporcionado la disponibilidad de genomas de algunas cepas del CMT, proporcionando una gran cantidad de información, cuyo análisis puede proporcionar una visión profunda de la biología y la evolución patógeno-hospedador.

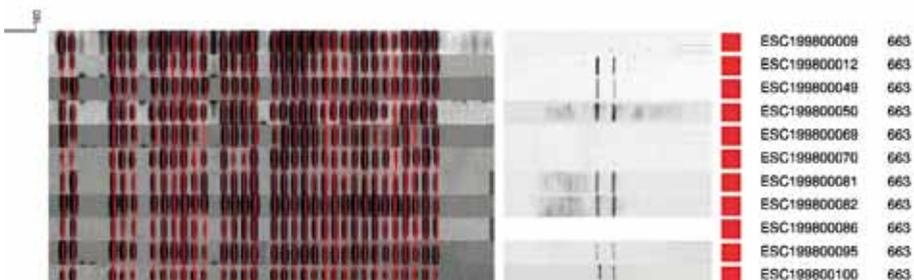
## Actualidad

La vigilancia molecular de las enfermedades infecciosas está ganando importancia, sobre todo en el contexto de la globalización y del resurgimiento de la tuberculosis. A esto se suma el aumento constante de aparición de cepas de tuberculosis multirresistentes (MDR) y extremadamente resistentes (XDR) a fármacos en distintas regiones del mundo. Estos datos acentúan aún más la necesidad del rastreo molecular, con el fin de detectar mejor, prevenir y entender las razones de la propagación de clones particulares a nivel local y global. En Europa, el 5% de los casos con resultados de pruebas de sensibilidad a los medicamentos (DST) es MDR, siendo más frecuente en los tres países bálticos, Estonia, Letonia y Lituania, que tienen entre el 11 y el 21% de todos los nuevos casos pulmonares MDR. En 2012, se informó de la tuberculosis XDR para el 14% de los casos de tuberculosis MDR que tenían resultados de DST a drogas de segunda línea (ECDC). En Aragón desde 2001 se genotipan todos los aislados. Un total de 29 casos se han identificado como pertenecientes a *M. bovis*, incluido BCG. Al menos 6 de los aislados de *M. bovis*-BCG fueron detectados en orina de pacientes que habían sido tratados con instilaciones vesicales, dos de ellos fueron considerados casos clínicos de tuberculosis en pacientes inmigrantes. En total los casos de tuberculosis producidos por *M. bovis*, supuso un 1,16% del total de casos de tuberculosis entre nuestra población. Los casos autóctonos de *M. bovis*, fueron principalmente en individuos mayores de 60 años, mientras que los casos provenientes del norte de África tenían unas edades comprendidas entre 22 y 43 años (Figura 1).



**Figura 1.** Aislados de *M. bovis* en pacientes de Aragón desde el año 2000, incluidos 9 aislados de *M. bovis* BCG, analizados mediante *spoligotyping* y IS6110-RFLP. Fuente: Universidad de Zaragoza.

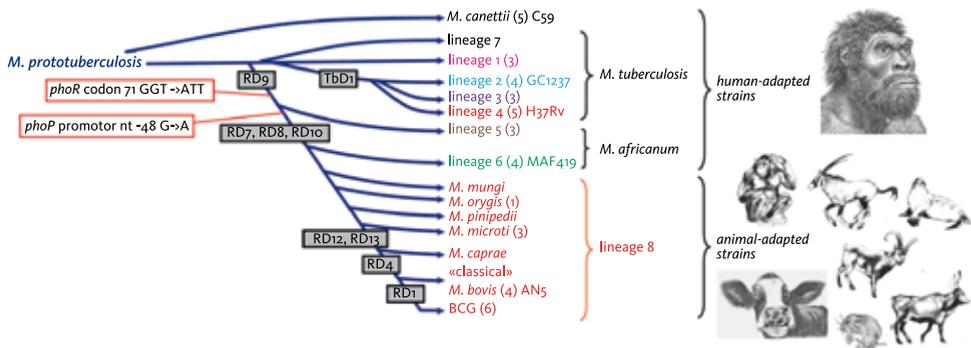
El conocimiento de las cepas MDR en nuestra población parece un mínimo requisito que valora la importancia de la transmisión o control en la población. La experiencia de tener en marcha la tecnología necesaria, hace que esto sea fácil y rápido. Desde el inicio de la base de datos en 1998, únicamente el aislado de *M. bovis* extremadamente resistente (XDR) que se transmitió exitosamente entre humanos, cepa “B”, cuyo *spoligotyping* presentaba el patrón SBo426 /SIT 663, ha sido aislado con características de MDR, y por el momento es el mayor cluster detectado con 38 casos hasta 2014 (Figura 2).



**Figura 2.** Aislados humanos de *M. bovis* XDR en España en el año 1998 analizados mediante *spoligotyping* y IS6110-RFLP. Fuente: Universidad de Zaragoza.

El análisis del genoma de la cepa “B”, además de clasificarla en el complejo Eu2, nos ha proporcionado información de la existencia de un gen no detectado en las cepas de referencia *M. bovis* AF2122/97, *M. bovis* BCG y *M. tuberculosis* H37Rv. Su estudio nos permitirá determinar si este gen, con homología a una bomba transportadora, podría estar involucrado en la sucesiva adquisición de resistencias por parte de esta cepa (enviado para su publicación).

Los polimorfismos genéticos entre especies del CMT pueden representar un cambio en el comportamiento y adaptación del bacilo en el proceso de entrada, infección y desarrollo de la tuberculosis en distintos hospedadores. En este contexto, recientemente hemos identificado un polimorfismo G71I en la proteína PhoR de *M. bovis* respecto a *M. tuberculosis*. PhoR forma parte de un sistema de dos componentes llamado PhoPR que se encarga de captar estímulos externos (como las señales dentro de los macrófagos) y promover una respuesta a estos estímulos en forma de regulación transcripcional de algunos genes. Nuestro grupo ha identificado recientemente la red de regulación de PhoPR utilizando técnicas de secuenciación global del transcriptoma (RNA-seq) junto al mapeo de los sitios de unión de PhoP (ChIP-seq) (Solans et al. 2014). Estos estudios han permitido descifrar los mecanismos moleculares por los cuales PhoPR regula la expresión de fenotipos importantes para la virulencia de las micobacterias como son la secreción del factor de virulencia ESAT-6 (Frigui et al. 2008) y la síntesis de lípidos inmunomoduladores basados en acil-trehalosa y sulfolípidos (Gonzalo-Asensio et al. 2006).

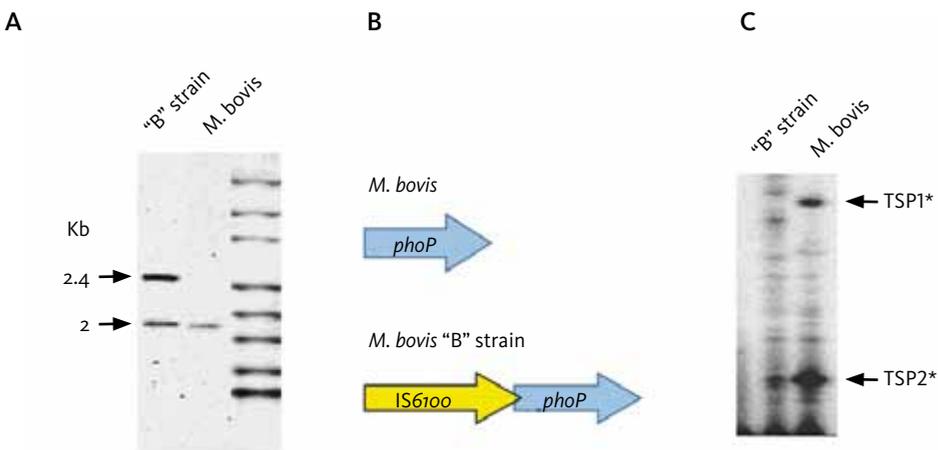


**Figura 3.** Filogenia del complejo *M. tuberculosis* indicando los polimorfismos en el sistema PhoPR que afectan a las especies adaptadas a animales. Como consecuencia de la mutación G71I en PhoR, este sistema no es funcional en las cepas adaptadas a animales. Fuente: Universidad de Zaragoza.

El estudio genético-molecular detallado del polimorfismo G71I en la proteína PhoR de *M. bovis* ha arrojado resultados sorprendentes, ya que un único cambio de aminoácido anula la funcionalidad del sistema PhoPR en *M. bovis* (Figura 3). Consecuentemente las cepas causantes de tuberculosis en animales han perdido la capacidad de regulación del sistema PhoPR y por tanto no sintetizan sulfolípidos ni lípidos basados en acil-trehalosa (Gonzalo-Asensio et al. 2014). Sin embargo, y a pesar de la mutación G71I, *M. bovis* es capaz de secretar ESAT-6. Un análisis detallado de la red de regulación de ESAT-6 nos ha permitido determinar el

mecanismo genético compensatorio por el cual *M. bovis* secreta este factor de virulencia. Se trata de diversos polimorfismos en la región 5' de los genes *espACD* que hacen que su regulación sea independiente de PhoPR en *M. bovis* (Gonzalo-Asensio et al. 2014). Ambos hallazgos ponen de manifiesto la importancia de los polimorfismos de la red de regulación PhoPR en la evolución del CMT y nos permite hipotetizar sobre su impacto en la relación patógeno-hospedador.

También nos interesa conocer los mecanismos por los que algunas cepas de *M. bovis* son capaces de transmitirse exitosamente entre los humanos, como es el caso de la cepa "B". Nuestros trabajos han demostrado que a diferencia de la mayoría de cepas de *M. bovis* que tienen una única copia de *IS6110*, esta cepa tiene dos copias, la segunda de ellas está delante del gen *PhoP* (Figura 4). Recientemente hemos demostrado cómo la segunda inserción de *IS6110* en la cepa "B" aumenta la producción de PhoP y esta expresión incrementada es capaz de compensar el polimorfismo G71I anteriormente citado. Así, el polimorfismo de la cepa "B" causa una mayor expresión de los genes regulados por PhoP y la producción de sulfolípidos y lípidos derivados de acil-trehalosas en *M. bovis* (Gonzalo-Asensio et al. 2014), lo que proporciona un mecanismo plausible para explicar la transmisión de esta cepa entre los humanos dada la importancia de PhoP en la virulencia.



**Figura 4.** Caracterización molecular de la cepa "B", que a diferencia de otras cepas de *M. bovis* es capaz de transmitirse entre los humanos. (A) Contenido de *IS6110* determinado mediante RFLP. Puede observarse como a diferencia del resto de cepas de *M. bovis*, la cepa "B" presenta dos copias de *IS6110*. (B) La segunda copia de esta secuencia de inserción se localizó delante del gen *phoP*. (C) Como consecuencia del salto de esta *IS6110*, la expresión de *phoP* está aumentada en la cepa "B".

## Futuro

En los próximos años se pretende continuar con la vigilancia epidemiológica de las cepas que causan tuberculosis en Aragón así como de las cepas resistentes a fármacos. Se prestará especial atención a aquellas cepas causantes de brotes con especial virulencia y se hará uso de herramientas de secuenciación global de genomas y genómica comparativa para la

identificación de polimorfismos que puedan explicar tanto la especial virulencia como la resistencia a drogas.

En este contexto estamos especialmente interesados en comprender los mecanismos por los que algunas cepas de *M. bovis* son capaces de transmitirse entre los humanos y realizar estudios similares a los llevados a cabo con la cepa “B” de *M. bovis*.

Dada la importancia de PhoPR en la virulencia del CMT, estamos especialmente interesados en profundizar aún más en el estudio de su mecanismo de acción. Esto nos permitirá caracterizar la vacuna MTBVAC (basada en la inactivación del gen *phoP*) que actualmente se encuentra en fase clínica en humanos (Arbués et al. 2013). Además el estudio de PhoPR nos permitirá comprender el efecto deletéreo de la mutación G71I sobre la proteína PhoR de *M. bovis*.

## Resumen

Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB			
Campo	Resultado	Aplicación	Referencias
Epidemiología	Identificación de los aislados de TB	En el ámbito de la salud pública, el diagnóstico de <i>M. bovis</i> en humanos es muy bajo debido al control de alimentos. El control e identificación de casos es necesario para conocer su situación	Rodríguez et al. 2009
Epidemiología	Análisis de filogenia	Análisis de diferencias entre miembros del complejo	Gonzalo-Asensio et al. 2014
Control	Candidato a vacuna	Aplicación en intervenciones de control poblacional	Arbués et al. 2013

## **18. NUEVOS ENFOQUES PARA EL ESTUDIO DE LA TRANSMISIÓN DEL COMPLEJO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EN SISTEMAS MULTI-HOSPEDADOR**

---

*Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), School of Health Sciences, University of Minho, Braga, Portugal; ICVS/3B's, PT Government Associate Laboratory, Braga/Guimarães, Portugal; CIBIO – Research Center on Biodiversity and Genetic Resources*

Contacto: Nuno Santos (pygargusv@sapo.pt)

### **Historia**

Hace una década no se había publicado nada sobre la tuberculosis en fauna silvestre en Portugal, aunque sí se habían hecho diagnósticos esporádicos durante la inspección de rutina de la carne de caza mayor. Se comenzó entonces a estudiar la epidemiología de la tuberculosis en el jabalí tomándola como una especie indicadora. Se estimó una prevalencia de hasta el 50% en algunas áreas de estudio, siendo mayor ésta en las hembras y en los jóvenes. La densidad relativa de jabalí demostró ser un factor de riesgo (Santos et al. 2009).

Otra línea de investigación trataba de comparar las pruebas de diagnóstico de la tuberculosis en el jabalí, destacando que la inspección macroscópica detectaba aproximadamente el 75% de los animales infectados, según lo determinado por cultivo bacteriológico (Figura 1). La combinación de diferentes pruebas de diagnóstico en paralelo aumentaba la sensibilidad hasta un 100%. Asimismo, se encontró evidencia de que el cultivo bacteriológico podría tener una sensibilidad limitada del 82% (Santos et al. 2010).

En 2012, una revisión sistemática de los trabajos publicados sobre la epidemiología de la tuberculosis de la fauna silvestre de la Península Ibérica reveló una prevalencia del 36% en las poblaciones de jabalí y 21% en las poblaciones de ciervos (Santos et al. 2012). Parece haber una tendencia temporal de la prevalencia en aumento, lo que apoya la teoría de que la tuberculosis en la fauna silvestre es una enfermedad emergente en la Península Ibérica. Los estudios epidemiológicos en jabalíes y ciervos, han permitido la identificación de varios factores de riesgo, por ejemplo, las charcas.

También se realizó un estudio de tuberculosis en bovino en Mozambique, identificando prevalencias de hasta un 76% en algunas áreas, identificándose varios factores de riesgo que promovían estos resultados (Moiane et al. 2014).

### Actualidad

Nuestra investigación se centra en la actualidad en los mecanismos intra e inter-específicos de transmisión de la infección. Los métodos de diagnóstico moleculares muestran que el CMT se excreta por vía oro-nasal, bronquial-alveolar y fecal en el 78% de los ungulados silvestres con lesiones, principalmente por las dos primeras. La mayoría de los excretores produjeron concentraciones de micobacterias pertenecientes al CMT  $<80$  MPN. Sin embargo, el 24% de los ciervos y el 7% de los jabalíes produjeron concentraciones  $>160$  MPN, considerándose éstos como super-excretores. Estos super-excretores representaron el 97% de la excreción de CMT detectado en todas las muestras de ciervos analizadas y el 59% de las de los jabalíes.

La transmisión indirecta de la infección requiere la contaminación del medio ambiente. Sin embargo, la contaminación ambiental con CMT ha sido difícil de detectar debido a cuestiones metodológicas. Se homogeneizaron 1000 g de muestras de suelo tras lo que hemos sido capaces de detectar CMT con un LD<sub>100</sub> de  $4 \times 10^4$  UFC/g. Haciendo uso de este protocolo se demostró que la contaminación por CMT está muy extendida en diferentes tipos de muestras ambientales. La detección varió con el tipo de muestra ambiental, y fue más frecuente en los sedimentos de las charcas y menos frecuente en el agua de las charcas (22% y 5%, respectivamente). La proporción de muestras de CMT-positivas fue significativamente mayor en primavera, pero la concentración por muestra fue mayor en otoño y menor en verano. La concentración media de ADN de CMT en muestras positivas fue de 0,82 MPN, detectándose *Mycobacterium bovis/caprae* en 4 de estas muestras ambientales.



**Figura 1.** La detección de lesiones macroscópicas e incluso el cultivo bacteriológico presentan una sensibilidad limitada en jabalí, recomendándose la combinación de diferentes técnicas diagnósticas para aumentar la sensibilidad.

## Futuro

Las líneas de investigación futuras incluyen el análisis espacial por clusters de la tuberculosis de la fauna, utilizando el jabalí como una especie indicadora, haciendo uso de pruebas serológicas, junto con la recolección a gran escala de las muestras mediante el uso de filtros de papel impregnados de sangre de los animales cazados. También se estudiará el papel epidemiológico de los super-excretores y la contaminación del medio ambiente.

## Resumen

Principales resultados y sus aplicaciones para el control de TB			
Campo	Resultado	Aplicación	Referencia
Epidemiología	Clustering espacial de TB en fauna silvestre con altas prevalencias en algunas poblaciones. La densidad de población y la tendencia histórica de población explican parcialmente la presencia de TB actual	Limitar la expansión de la TB en la fauna silvestre como herramienta de control (limitar las traslocaciones, manejo específico de las densidades de población en la periferia de los clusters infectados)	Santos et al. 2009
Diagnóstico	La detección de lesiones macroscópicas en jabalí tiene una sensibilidad limitada. Los tests de referencia (cultivo) también presentan una sensibilidad limitada. La combinación de diferentes técnicas de diagnóstico incrementa la sensibilidad	La identificación de lesiones macroscópicas en campo no puede proteger completamente la salud pública. La combinación de diferentes técnicas diagnósticas eleva la sensibilidad	Santos et al. 2010
Epidemiología	Clustering espacial de TB en la fauna silvestre en la Península Ibérica. Existen áreas sin estudiar	Casos control y estudios experimentales en campo pueden dar lugar a información útil para el control de la enfermedad	Santos et al. 2015





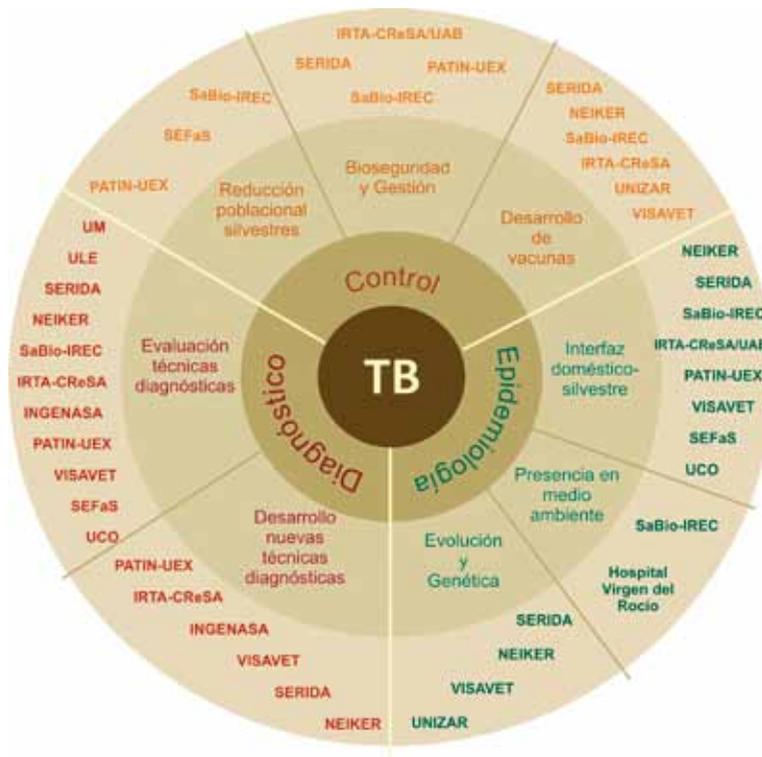
**CONCLUSIONES  
Y PERSPECTIVAS  
FUTURAS:  
BASES PARA  
EL CONTROL**

Ana Balseiro  
Bernat Pérez de Val  
Lucía de Juan  
Christian Gortázar



### Conclusiones y perspectivas futuras: bases para el control

El I Workshop Nacional de Investigación en Tuberculosis Animal ha servido de plataforma para reunir a los principales grupos de investigación españoles en tuberculosis y, además, para identificar las sinergias que existen entre ellos. En la Figura 1 se pueden observar las temáticas principales en las que se trabaja actualmente en España y los diferentes grupos implicados en ellas.



**Figura 1.** En este gráfico se representan las tres principales temáticas de trabajo de la investigación española en tuberculosis “Epidemiología, Diagnóstico y Control” y, los diferentes grupos que intervienen en ellas. Se han podido identificar las sinergias entre las diferentes investigaciones con el fin de poder establecer consorcios, unir fuerzas y evitar solapamientos.

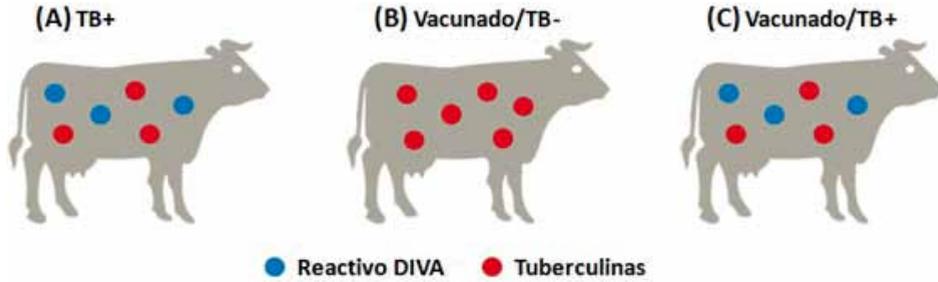
Tradicionalmente el control de la tuberculosis se ha basado en la prueba de la intradermotuberculinización (IDTB) y detección del  $\gamma$ -IFN, y el sacrificio de los animales positivos y/o a través de la vigilancia a nivel de matadero. Con esta sistemática se ha conseguido disminuir notablemente la prevalencia de la tuberculosis bovina. Sin embargo, no solo no ha sido posible erradicar la enfermedad, sino que la prevalencia se ha estancado, existiendo todavía determinadas regiones o unidades locales veterinarias donde la prevalencia se mantiene elevada o incluso ha aumentado. Por consiguiente, se hace necesario desarrollar nuevas estrategias que ayuden a luchar contra la enfermedad en este contexto. En esta reunión se han identificado tres pilares desde los que la comunidad científica puede contribuir a este propósito:

### *Desarrollo de nuevas técnicas de diagnóstico*

El diagnóstico es la principal herramienta de vigilancia, seguimiento y erradicación. La investigación en el diagnóstico de la tuberculosis se centra en optimizar las pruebas oficiales (IDTB, detección de  $\gamma$ -IFN) y en desarrollar y evaluar nuevas técnicas o reactivos de diagnóstico con el objetivo principal de detectar a los animales infectados, evitando así los falsos positivos.

La IDTB es la piedra angular del diagnóstico de la tuberculosis bovina. Esta prueba se basa en la inoculación intradérmica de un derivado proteico purificado de *M. bovis* (PPD o tuberculina bovina) y el estudio posterior de su reacción de hipersensibilidad tipo IV que se traduce como un incremento en el grosor de la piel. El rendimiento de esta técnica puede verse afectado por distintos factores incluyendo entre otros, la potencia biológica de la tuberculina empleada. En este sentido, VISAVET está evaluando en la actualidad antígenos alternativos que puedan sustituir a las tuberculinas actuales sin perder en ningún caso sensibilidad diagnóstica. Estos antígenos deberían reducir o incluso eliminar las interferencias debidas a infecciones o sensibilizaciones causadas por otras micobacterias no tuberculosas (como por ejemplo *M. avium* subsp. *paratuberculosis*) o infecciones causadas por bacterias filogenéticamente relacionadas con el género *Mycobacterium* (como *Corynebacterium pseudotuberculosis*). Además, muchos de estos antígenos se conciben también según el principio DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals), con la capacidad de distinguir animales vacunados con BCG (u otras vacunas basadas en micobacterias vivas) de animales infectados (Figura 2).

Al igual que la IDTB, esta prueba está basada en el uso de antígenos específicos y presenta los mismos problemas de especificidad y los mismos retos a nivel de investigación. Por este motivo los estudios de vacunación llevados a cabo por IRTA-CReSA y VISAVET han ido acompañados de la evaluación de nuevos reactivos DIVA para su uso en la prueba de la IDTB y  $\gamma$ -IFN.



**Figura 2.** Representación esquemática de los diferentes resultados de una prueba DIVA ideal. (A) Animal infectado (TB+) y no vacunado será detectado por ambos reactivos (DIVA y tuberculinas); (B) Animal vacunado y no infectado (TB-), será negativo con los reactivos DIVA pero puede ser falso positivo con las pruebas basadas en tuberculinas; (C) Animal vacunado e infectado. También será detectado por ambas pruebas. Fuente: CRESA.

La técnica de detección de  $\gamma$ -IFN, también es una prueba de diagnóstico oficial y por lo tanto se trabaja para mejorar su rendimiento diagnóstico; de hecho los estudios que se llevan actualmente a cabo se centran en el uso de antígenos más específicos al igual que la estandarización del protocolo en los laboratorios oficiales de diagnóstico.

Aunque las principales técnicas de diagnóstico de la tuberculosis se basan en la respuesta inmune celular, actualmente se está trabajando en el desarrollo de técnicas serológicas (por ejemplo ELISA) que permitan detectar la tuberculosis en distintas especies tanto domésticas en estudios de experimentación como de fauna silvestre como el ciervo, el jabalí, el tejón etc. En el caso del ganado bovino, estas técnicas serológicas, incluso aprovechándose del efecto *booster*, no se consideran hoy día como una alternativa diagnóstica a las pruebas oficiales aunque en un futuro podrían considerarse como complementarias al menos a escala de rebaño. Sin embargo, en los animales silvestres, esta metodología es una ventaja frente a las técnicas previamente descritas, ya que se caracterizan por ser test rápidos que pueden ser utilizados a pie de campo (por ejemplo los test rápidos de Chembio, Nueva York). En el caso concreto del jabalí ya se comercializa una prueba con alta especificidad y buena sensibilidad (Kit ELISA *M. bovis*, Vacunek, Derio) y hay nuevos test en desarrollo (ver resumen de INGENASA, Madrid).

Por último, dentro del diagnóstico *post-mortem*, se están desarrollando herramientas diagnósticas de confirmación de la enfermedad que puedan sustituir al cultivo microbiológico, cuyo principal inconveniente es el tiempo de incubación. En este sentido, el Centro VI-SAVET está poniendo a punto técnicas de detección directa de ADN a partir de tejidos de los animales reactivos a las pruebas *in vivo*. De esta forma se reduce el tiempo de confirmación de la enfermedad lo que tiene una repercusión directa en el desarrollo de las campañas de erradicación de la tuberculosis.

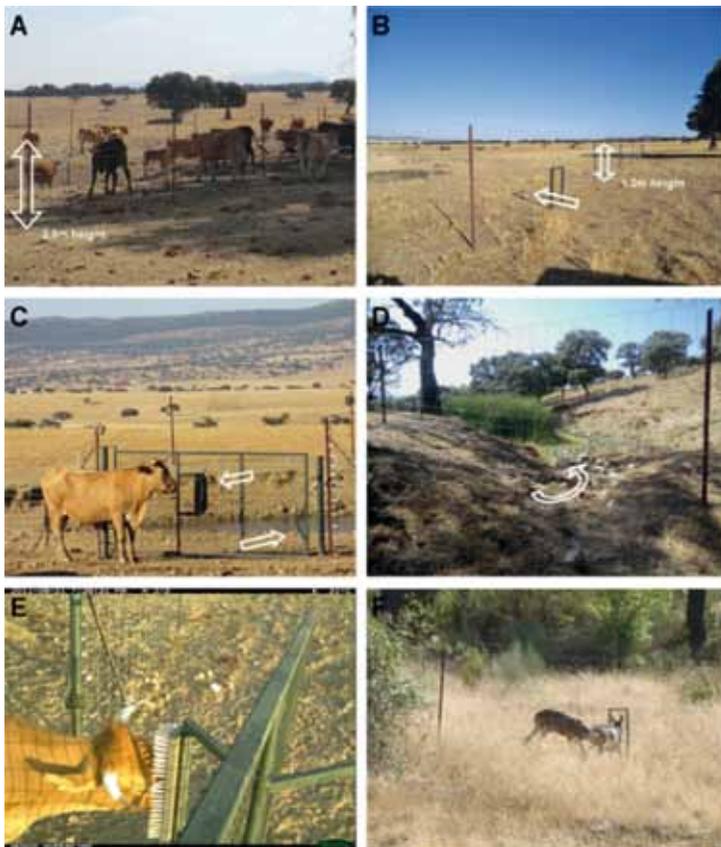
### Bioseguridad

Los antecedentes nos indican que para poder controlar la transmisión y persistencia de la tuberculosis en las zonas de contacto entre ganado doméstico y fauna silvestre es necesario comprender en profundidad su dinámica de transmisión. Este conocimiento debe abarcar todos los reservorios potenciales, domésticos y silvestres. Se evidencia por tanto la necesidad de, una vez conocidos los factores locales que operan, elaborar programas de mitigación del riesgo específicos para cada explotación en riesgo. Los ganaderos son conscientes de este

problema y demandan de los servicios veterinarios la implementación de medidas prácticas que reduzcan la exposición del ganado frente a la tuberculosis y otras enfermedades compartidas con la fauna silvestre.

En este sentido por ejemplo SaBio IREC ha diseñado y testado con éxito una puerta selectiva operable solamente por ganado bovino (Barasona et al. 2013b, Figura 3), reduciendo significativamente la prevalencia de tuberculosis en el rebaño de estudio frente a rebaños control. La bioseguridad puede extenderse a muchos otros aspectos: tipos de bebedero, comederos selectivos, vallados perimetrales, uso estacional de pastizales, riesgos debidos a otras especies ganaderas y un largo etcétera.

Todo esto supone un importante logro de cara a la implementación de herramientas útiles en la creación de programas de mitigación del riesgo específicos como base para el control de enfermedades compartidas.



**Figura 3.** Se ilustran algunas herramientas disponibles para implementar programas de mitigación de riesgo de contacto entre ganado y fauna en explotaciones extensivas, mediante pasos selectivos para un grupo u otro, según Barasona et al. (2013b). (A) Vallado a prueba de ungulados silvestres en abrevadero de ganado, (B) valla a prueba de bovino en una charca para la fauna silvestre, apto para saltar ciervos, o bien con pasos inferiores para pequeños rumiantes, (C) puerta selectiva para el ganado bovino, (D) paso inferior en la valla apto para el jabalí y el corzo, (E) brazo con cepillo para la puerta selectiva de bovino, (F) apertura para el corzo (y potencialmente jabalíes) en un cerca a prueba de ganado. Estas herramientas de segregación de ungulados se mostraron efectivas para disminuir significativamente la prevalencia de tuberculosis en la explotación tras una única campaña de saneamiento (Barasona et al. 2013b).

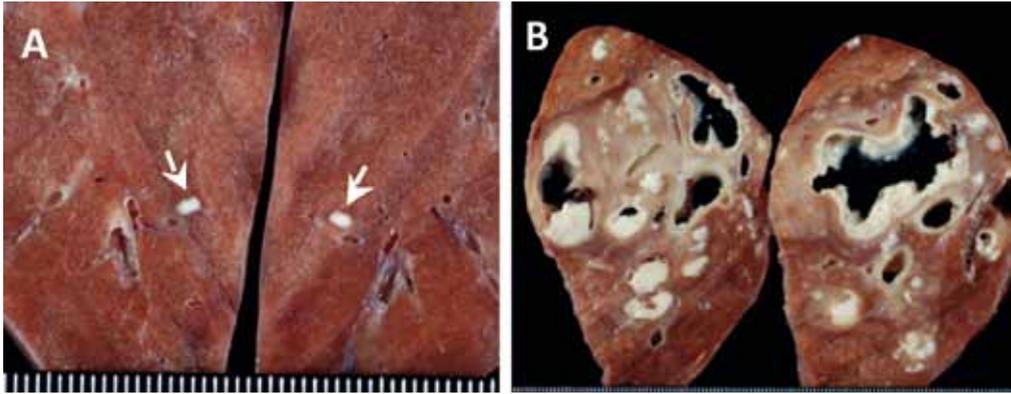
## Vacunación

La vacunación es una de las estrategias de control de la tuberculosis que más esfuerzos está focalizando a nivel de investigación en los últimos años. A pesar del éxito que ha supuesto la estrategia de “prueba y sacrificio” en la erradicación de la tuberculosis animal en muchos países, la vacunación, en determinadas situaciones epidemiológicas, se percibe como mejor opción a corto y medio plazo para el control de tuberculosis, particularmente en la fauna silvestre.

La primera vacuna contra la tuberculosis (cuyo uso en personas continúa) es el bacilo de Calmette-Guérin, más conocido por sus siglas BCG, que data de principios del siglo XX. Se trata de una cepa atenuada de *M. bovis*, que sus creadores, Albert Calmette y Camille Guérin, obtuvieron tras la realización de múltiples cultivos en medio de patata, glicerina y bilis de una cepa virulenta que habían aislado de una vaca tuberculosa. Casi un siglo después, la OMS continúa recomendando su uso en países donde la tuberculosis es endémica. Hasta la fecha, se ha aplicado en más de 4000 millones de personas.

La BCG también ha sido ampliamente estudiada de forma experimental en la especie bovina, pero su uso está prohibido de forma explícita por la legislación de la UE en el ganado bovino (Directiva del Consejo 78/52/CEE). El motivo principal de esta prohibición es la interferencia que la vacunación puede ocasionar en el diagnóstico oficial de la enfermedad mediante la IDTB.

La eficacia y la seguridad de la vacuna BCG ha sido también evaluada en otras especies domésticas (caprinos) y silvestres (tejones, cérvidos, jabalíes, zarigüeyas). De hecho, la vacunación con BCG en tejones ha sido recientemente autorizada en el Reino Unido. Gran parte de la investigación del IRTA-CReSA en los últimos años se ha focalizado en la evaluación de vacunas en la especie caprina. Mientras que la tuberculosis bovina está sometida a programas de erradicación en diversos países de la UE, la tuberculosis caprina no aparece en la lista de enfermedades de declaración obligatoria de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, [www.oie.int](http://www.oie.int)) y tampoco existe una estrategia europea de erradicación. No obstante la legislación europea explícita que la tuberculosis debe ser controlada en especies no bovinas productoras de leche (Reglamento 853/2004 del Consejo de Europa). Las cabras son particularmente susceptibles a la infección tuberculosa y la vacunación puede ser una buena alternativa a la estrategia de “prueba y sacrificio” en rebaños de caprino con elevada prevalencia de la enfermedad. El IRTA-CReSA ha obtenido resultados satisfactorios de vacunación de caprinos tanto con la vacuna BCG como con otras vacunas vivas prototipo en condiciones experimentales (Figura 4, Pérez de Val et al. 2012a; 2012b). En la actualidad se están llevando a cabo estudios de vacunación en condiciones de campo que abren la perspectiva de la posibilidad de vacunación del ganado caprino a medio plazo. Otro grupo de investigación que está desarrollando pruebas de vacunación en cabras es VISAVET con el estudio de dos vacunas desarrolladas por grupos españoles (MdJTBVAC de NEIKER y *M. tuberculosis* SO2 de UNIZAR).



**Figura 4.** Evaluación de la eficacia de vacunas en cabras infectadas experimentalmente con *Mycobacterium caprae*. (A) Dos cortes dorsoventrales consecutivos, de 5 mm de grosor cada uno, del lóbulo diafragmático derecho del pulmón de una cabra vacunada y posteriormente infectada experimentalmente. Se observa una única lesión granulomatosa de 2 mm de diámetro (flechas). (B) Idénticos cortes en una cabra no vacunada e infectada experimentalmente. Se observan múltiples y extensas lesiones con formación de cavidades. Fuente: CReSA.

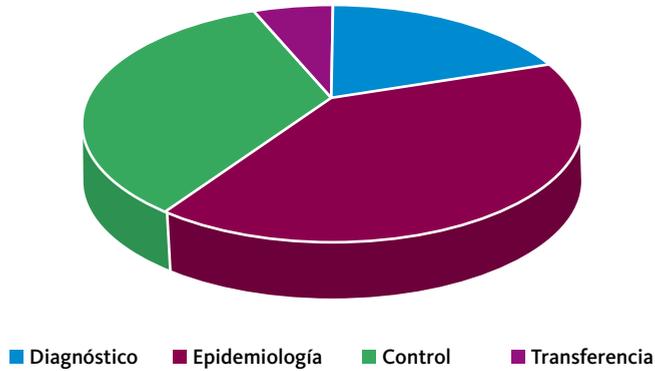
Recientemente también se ha desarrollado un prototipo de vacuna inactivada de *M. bovis* (MdJTBVAC) en NEIKER, fruto de la colaboración con SaBio-IREC y VISAVET. Esta vacuna obtiene resultados de protección muy satisfactorios en su aplicación a jabalí (Garrido et al. 2011; Beltrán-Beck et al. 2014c) y que pueden además extrapolarse al cerdo doméstico. Actualmente (2012-2015) se está desarrollando en Montes de Toledo una ambiciosa prueba de campo de vacunación oral de jabalíes. Los resultados preliminares indican un excelente nivel de protección con la vacuna inactivada. En los próximos años se estudiará (en condiciones de laboratorio) la respuesta de bovinos, caprinos, ovinos, ciervos y tejones, por parte de los grupos SaBio-IREC, NEIKER, IRTA-CReSA, SERIDA y VISAVET. Estos resultados serán de gran interés para el control de la tuberculosis, ya que las vacunas inactivadas no parecen sensibilizar o hacerlo mínimamente frente a los test de diagnóstico, y suponen un nulo riesgo biológico para su uso en condiciones de campo.

### **Investigando la tuberculosis animal:**

#### **Temas priorizados por los grupos ibéricos de I+D para el futuro**

Las aportaciones de los investigadores que participan en este workshop han permitido identificar 60 propuestas de I+D sobre tuberculosis animal, que se pueden dividir por campos como se muestra en la siguiente Figura.

### Propuestas para I+D futura sobre tuberculosis animal



**Figura 5.** Proporción de propuestas de los grupos de I+D ibéricos en distintos campos, en relación con la tuberculosis animal.

#### *Diagnóstico*

Ocho de los grupos de I+D mencionan objetivos relativos al diagnóstico en sus propuestas. Como cabe esperar, las propuestas abarcan tanto la mejora de las pruebas celulares como el desarrollo de pruebas complementarias basadas en inmunidad humoral. Un aspecto original es la investigación para mejorar la capacidad de detectar el complejo *M. tuberculosis* en muestras de tejidos, de agua o de otros sustratos.

#### *Epidemiología*

Doce de los grupos proponen objetivos de I+D del campo de la epidemiología. Esto incluye temas clásicos pero todavía actuales, como el análisis de riesgos en explotaciones ganaderas (4 propuestas), las aplicaciones de la epidemiología molecular (3), la monitorización sanitaria (2) y los determinantes genéticos de resistencia a tuberculosis (1).

El tema de mayor actualidad es el de las interacciones entre especies, con 7 propuestas de 5 grupos de I+D. Seguramente, entender en profundidad cómo se produce el contacto directo e indirecto entre diferentes especies domésticas y silvestres es una de las bases para comprender la compleja epidemiología de CMT en la Península Ibérica. Este campo, aunque amplio, requiere colaboraciones entre grupos a fin de optimizar los recursos y capacidades. Otro tema de actualidad, propuesto por al menos cuatro grupos, es la detección de CMT en el medio ambiente, y el estudio de las vías de excreción. Este es un campo que también se presta a colaboraciones entre grupos.

Además, hay grupos que plantean objetivos innovadores, como por ejemplo el estudio económico del control de tuberculosis, el papel de las co-infecciones en la patogenia de la tuberculosis y sus consecuencias epidemiológicas, o la interacción entre nutrición y tuberculosis.

### *Control*

Con 21 propuestas de nueve grupos de I+D, es muy positivo ver cómo las estrategias de control van tomando fuerza en el campo de la investigación sobre tuberculosis animal en España. La mitad de las propuestas, once, se relacionan con la vacunación. Esto evidencia que las estrategias de vacunación centran buena parte de las esperanzas de control de la tuberculosis, al menos por parte del mundo académico. En 2015 se han concedido dos proyectos nacionales sobre ese tema, que usarán como modelos a cuatro especies de rumiantes y un carnívoro, el tejón. Esta información se unirá a la capacidad ya desarrollada para cerdo y jabalí. Cabe esperar mucho de este campo en los próximos tres años.

Una tendencia emergente es la del establecimiento de programas prácticos de bioseguridad en explotaciones ganaderas extensivas. Estas propuestas (3), apoyadas también en sendos proyectos nacionales, tienen la virtud de involucrar directamente a los ganaderos en el control de la tuberculosis.

Otros aspectos del control de tuberculosis, no menos importantes, son el control poblacional de reservorios silvestres y las aplicaciones prácticas de los conocimientos genéticos a nivel de hospedador y de patógeno.

### *Transferencia*

El último aspecto novedoso en esta clase de foros es el énfasis en la transferencia del conocimiento desde el sector académico a las administraciones responsables de sanidad animal y a los sectores ganadero y cinegético. Diversas propuestas pretenden llevar a mercado los resultados de I+D desarrollados hasta la fecha, tales como nuevos diagnósticos y herramientas de control. Se hace especial énfasis en la oportunidad de implicar al sector ganadero extensivo en la lucha contra la tuberculosis, mediante la transferencia de resultados de investigación a través de los citados programas de bioseguridad.

### ***Colaborando se lograrán nuevos avances***

La Figura 1, que esquematiza las actividades de los diversos grupos de investigación españoles en relación con la tuberculosis animal, pone de manifiesto que en nuestro país existe una buena masa crítica. Pero al mismo tiempo, esa figura también evidencia solapamiento y duplicación de esfuerzos. Por ello, es imprescindible coordinar los esfuerzos entre grupos, por ejemplo a través de consorcios que aborden proyectos coordinados.

Los avances en el control de la tuberculosis animal deben transferirse en lo posible al Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA) o al que ejerza las competencias en sanidad animal, para seguir mejorando los programas de control; deben transferirse a los sectores ganaderos y a la industria veterinaria para mejorar sus respectivas actividades productivas; y deben servir además para reforzar el liderazgo español en la investigación internacional sobre tuberculosis, tanto dentro como fuera de Europa. Si este libro contribuye a alcanzar este objetivo, el esfuerzo habrá merecido la pena.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- Abendaño N, Juste RA, Alonso-Hearn M. 2013a. Anti-inflammatory and antiapoptotic responses to infection: A common denominator of human and bovine macrophages infected with *Mycobacterium avium* Subsp. *paratuberculosis*. *Biomed Research International* 2013: 908348. doi: 10.1155/2013/908348.
- Abendaño N, Sevilla IA, Prieto JM, Garrido JM, Juste RA, Alonso-Hearn M. 2013b. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* isolates from sheep and goats show reduced persistence in bovine macrophages than cattle, bison, deer and wild boar strains regardless of genotype. *Veterinary Microbiology* 163(3-4): 325-34. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.12.042.
- Abendaño N, Tyukalova L, Barandika JF, Balseiro A, Sevilla IA, Garrido JM, Juste RA, Alonso-Hearn M. 2014. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* isolates induce in vitro granuloma formation and show successful survival phenotype, common anti-inflammatory and antiapoptotic responses within ovine macrophages regardless of genotype or host of origin. *PLoS ONE* 9: e104238. doi: 10.1371/journal.pone.0104238.
- Acevedo P, Vicente J, Ruiz-Fons JF, Cassinello J, Gortázar C. 2007. Estimation of European wild boar relative abundance and aggregation: a novel method in epidemiological risk assessment. *Epidemiology and Infection* 135: 519-527.
- Acevedo P, Ruiz-Fons F, Vicente J, Reyes-García AR, 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, Romero B, Vicente J, Caracappa S, Galluzzo P, Marineo S, Vicari D, Torina A, Casal C, de la Fuente J, Gortazar C. 2013. Tuberculosis epidemiology in islands: insularity, hosts and trade. *PLoS ONE* 8: e71074.
- Acevedo P, González-Quirós P, Etherington TR, Prieto JM, Gortázar C, Balseiro A. 2014a. Generalizing and transferring spatial models: a case study to predict Eurasian badger abundance in Atlantic Spain. *Ecological Modelling* 275: 1-8.
- Acevedo P, Quiros-Fernandez F, Casal J, Vicente J. 2014b. Spatial distribution of wild boar population abundance: basic information for spatial epidemiology and wildlife management. *Ecological Indicators* 36: 594-600.

- Acevedo-Whitehouse K, Vicente J, Gortazar C, Höfle U, Fernández-de-Mera IG, Amos W. 2005. Genetic resistance to bovine tuberculosis in the Iberian wild boar. *Molecular Ecology* 14: 3209-3217.
- Allepuz A, Casal J, Napp S, Saez M, Alba A, Vilar M, Domingo M, González MA, Duran-Ferrer M, Vicente J, Alvarez J, Muñoz M, Saez JL. 2011. Analysis of the spatial variation of bovine tuberculosis disease risk in Spain (2006-2009). *Preventive Veterinary Medicine* 1: 44-52.
- Alonso JM, Hermoso de Mendoza J, Rey J, Gil L, Antón J, Hermoso de Mendoza M. 1992. Estudio preliminar de algunos casos de tuberculosis en jabalí (*Sus scrofa*) registrados en la provincia de Cáceres. *Aegyptus* 10: 49-53.
- Álvarez J, de Juan L, Bezos J, Romero B, Sáez JL, Reviriego FJ, Briones V, Moreno MA, 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 JL, 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, Perez A, Bezos J, Marqués S, Grau A, Saez JL, Mínguez O, de Juan L, Domínguez L. 2012. 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.
- Alonso-Hearn M, Molina E, Geijo MV, Vázquez P, Sevilla I, Garrido JM, Juste RA. 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: 618-29. doi: 10.3168/jds.2009-2860.
- Aranaz A, Cousins D, Mateos A, Domínguez L. 2003. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53(Pt 6): 1785-1789.
- Arbués A, Aguilo JI, Gonzalo-Asensio J, Marinova D, Uranga S, Puentes E, Fernandez C, Parra A, Cardona PJ, Vilaplana C, Ausina V, Williams A, Clark S, Malaga W, Guilhot C, Gicquel B, Martin C. 2013. Construction, characterization and preclinical evaluation of MTBVAC, the first live-attenuated *M. tuberculosis*-based vaccine to enter clinical trials. *Vaccine* 31: 4867-73.
- Arrazuria R, Molina E, Mateo-Abad M, Arostegui I, Garrido JM, Juste RA, Elguezabal N. En prensa. Effect of various dietary regimens on oral challenge with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in a rabbit model. *Research in Veterinary Science*.
- Arrazuria R, Sevilla IA, Molina E, Perez V, Garrido JM, Juste RA, Elguezabal N. En prensa. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies in the gut associated lymphoid tissue of slaughtered rabbits. *BMC Veterinary Research*.
- Aurtenetxe O, Barral M, Vicente J, de la Fuente J, Gortázar C, Juste RA. 2008. Development and validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies against *Mycobacterium bovis* in European Wild Boar. *BMC Veterinary Research* 4: 43. doi: 10.1186/1746-6148-4-43.

- Ayele WY, Neill SD, Zinsstag J, Weiss MG, Pavlik I. 2004. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease* 8: 924-937.
- Ballesteros C, Garrido JM, Vicente J, Romero B, Galindo RC, Minguijón E, Villar M, Martín-Hernando MP, Sevilla I, Juste R, Aranaz A, de la Fuente J, Gortázar C. 2009. 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, 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, Prieto JM, Espí A, Pérez V, García Marín JF. 2003. Presence of focal and multifocal paratuberculosis lesions in mesenteric lymph nodes and ileocaecal valve of cattle positive to the tuberculin test. *The Veterinary Journal* 166: 210-212.
- Balseiro A, Oleaga A, Orusa R, Robetto S, Zoppi S, Dondo A, Gorla M, Gortázar C, García Marín JF, Domenis L. 2009. Tuberculosis in roe deer from Spain and Italy. *The Veterinary Journal* 164: 468-470.
- Balseiro A, Merediz I, Sevilla IA, García-Castro MC, Gortázar C, Prieto JM, Delahay RJ. 2011a. Infection of Eurasian badgers (*Meles meles*) with *Mycobacterium avium* Complex (MAC) bacteria. *The Veterinary Journal* 188: 231-233.
- Balseiro A, Rodríguez O, González-Quirós P, Merediz I, Sevilla IA, Dipesh D, Dalley DJ, Leseillier S, Chambers MA, Bezos J, Muñoz M, Delahay RJ, Gortázar C, Prieto JM. 2011b. *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium* complex infections in Eurasian badgers (*Meles meles*) in Spain. *The Veterinary Journal* 190: e21 - e25.
- Balseiro A, González-Quirós P, Rodríguez O, Copano MF, Merediz I, de Juan L, Chambers MA, Delahay RJ, Marreros N, Royo LJ, Bezos J, Prieto JM, Gortázar C. 2013. Spatial relationships between Eurasian badgers (*Meles meles*) and cattle infected with *Mycobacterium bovis* in Northern Spain. *The Veterinary Journal* 197: 739-745.
- Barasona JA, López-Olvera JR, Beltrán-Beck B, Gortázar C, Vicente J. 2013a. Trap-effectiveness and response to tiletamine-zolazepam and medetomidine anaesthesia in Eurasian wild boar captured with cage and corral traps. *BMC Veterinary Research* 9: 107.
- Barasona JA, VerCauteren KC, Saklou N, Gortazar C, Vicente J. 2013b. Effectiveness of cattle operated bump gates and exclusion fences in preventing ungulate multi-host sanitary interaction. *Preventive Veterinary Medicine* 111: 42-50.
- Barasona JA, Latham MC, Acevedo P, Armenteros JA, Latham ADM, Gortazar C, Carro F, Sorriquer RC, Vicente J. 2014a. Spatiotemporal interactions between wild boar and cattle: implications for cross-species disease transmission. *Veterinary Research* 45: 122.
- Barasona JA, Mulero-Pázmány M, Acevedo P, Negro JJ, Torres MJ, Gortázar C, Vicente J. 2014b. Unmanned aircraft systems for studying spatial abundance of ungulates: Relevance to spatial epidemiology. *PLoS ONE* 9: e115608.
- Bastida F, Juste RA. 2011. Paratuberculosis control: a review with a focus on vaccination. *Journal of Immune Based Therapies and Vaccines* 9: 8. doi: 10.1186/1476-8518-9-8.

- 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* 97:8501.
- Beltrán-Beck B, Romero B, Boadella M, Casal C, Bezos J, Mazariegos M, Martín M, Galindo RC, Pérez de la Lastra JM, Villar M, Garrido JM, Sevilla IA, Asensio F, Sicilia J, Lyashchenko KP, Domínguez L, Juste RA, de la Fuente J, Gortázar C. 2014a. 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(8): 1128-1136.
- Beltrán-Beck B, Romero B, Sevilla I, Barasona J, Garrido J, González-Barrio D, Díez-Delgado I, Minguijón E, Casal C, Vicente J, Gortázar C, Aranaz A. 2014b. Oral BCG vaccine and an inactivated *Mycobacterium bovis* preparation for wild boar (*Sus scrofa*): Adverse reactions, vaccine strain survival and uptake by non-target species. *Clinical and Vaccine Immunology* 21: 12-20.
- Beltrán-Beck B, de La Fuente J, Garrido JM, Aranaz A, Sevilla I, Villar M, Boadella M, Galindo RC, Pérez de la Lastra JM, Moreno-Cid JA, G. Fernández de Mera I, Alberdi P, Santos G, Ballesteros C, Lyashchenko KP, Minguijón E, Romero B, de Juan L, Domínguez L, Juste R, Gortázar C. 2014c. Oral vaccination with heat inactivated *Mycobacterium bovis* activates the complement system to protect against tuberculosis. *PLoS ONE* 9 (5): e98048.
- Bezos J, Álvarez J, de Juan L, Romero B, Rodríguez S, Castellanos E, Saéz-Llorente JL, Mateos A, Domínguez L, Aranaz A. 2011. Factors influencing the performance of an interferon-gamma assay for the diagnosis of tuberculosis in goats. *The Veterinary Journal* 190: 131-135.
- Bezos J, Álvarez J, Romero B, Aranaz A, de Juan L. 2012. Tuberculosis in goats: Assessment of current in vivo cell-mediated and antibody-based diagnostic assays. *The Veterinary Journal* 191: 161-165.
- Bezos J, Casal C, Álvarez J, Díez-Guerrier A, Rodríguez-Bertos A, Romero B, Rueda P, López L, Domínguez L, de Juan L. 2013. Evaluation of the performance of cellular and serological diagnostic tests for the diagnosis of tuberculosis in an alpaca (*Vicugna pacos*) herd naturally infected with *Mycobacterium bovis*. *Preventive Veterinary Medicine* 111: 304-13.
- Bezos J, Casal C, Romero B, Schroeder B, Hardegger R, Raeber AJ, López L, Rueda P, Domínguez L. 2014a. Current ante-mortem techniques for diagnosis of bovine tuberculosis. *Research in Veterinary Science* 97: 544-552.
- Bezos J, Marqués S, Álvarez J, Casal C, Romero B, Grau A, Mínguez O, Domínguez L, de Juan L. 2014b. Evaluation of single and comparative intradermal tuberculin tests for tuberculosis eradication in caprine flocks in Castilla y León (Spain). *Research in Veterinary Science* 96: 39-46.
- Bezos J, Romero B, Delgado A, Alvarez J, Casal C, Venteo A, González I, Domínguez L, de Juan L. 2014c. Evaluation of the specificity of intradermal tuberculin and serological tests for diagnosis of tuberculosis in alpaca (*Vicugna pacos*) and llama (*Lama glama*) herds under field conditions in Peru. *Veterinary Record* 174: 532. doi: 10.1136/vr.102463.
- Boadella M, Acevedo P, Vicente J, Mentaberre G, Balseiro A, Arnal M, Martínez D, García-Bocanegra I, Casal C, Álvarez J, Oleaga A, Lavín S, Muñoz M, Sáez-Llorente JL, de la Fuente J, Gortázar C. 2011a. Spatio-temporal trends of iberian wild boar contact with *Mycobacterium tuberculosis* Complex detected by ELISA. *EcoHealth* 4: 478-484.

- Boadella M, Lyashchenko K, Greenwald R, Esfandiari J, Jaroso R, Carta T, Garrido JM, Vicente J, de la Fuente J, Gortazar C. 2011b. Serological tests for detecting antibodies against *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Eurasian wild boar (*Sus scrofa scrofa*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23: 77-83.
- Boadella M, Barasona JA, Diaz-Sanchez S, Lyashchenko KP, Greenwald R, Esfandiari J, Gortazar C. 2012a. Performance of immunochromatographic and ELISA tests for detecting fallow deer infected with *Mycobacterium bovis*. *Preventive Veterinary Medicine* 104: 160-164.
- Boadella M, Vicente J, Ruiz-Fons F, de la Fuente J, Gortazar C. 2012b. Effects of culling Eurasian wild boar on the prevalence of *Mycobacterium bovis* and Aujeszky's disease virus. *Preventive Veterinary Medicine* 107: 214-221.
- Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST. 2002. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99: 3684-3689.
- Buendía AJ, Navarro JA, 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.
- Casal C, Bezos J, Díez-Guerrier A, Álvarez J, Romero B, de Juan L, Rodriguez-Campos S, Vordermeier M, Whelan A, Hewinson RG, Mateos A, Domínguez L, Aranaz A. 2012. Evaluation of two cocktails containing ESAT-6, CFP-10 and Rv-3615c in the intradermal test and the interferon-gamma assay for diagnosis of bovine tuberculosis. *Preventive Veterinary Medicine* 105: 149-154.
- Casal C, Díez-Guerrier A, Álvarez J, Rodriguez-Campos S, Mateos A, Linscott R, Martel E, Lawrence JC, 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: 342-51.
- Castillo L, Fernández-Llario P, Mateos C, Carranza J, Benítez-Medina JM, García-Jiménez WL, 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.
- Cerrato R, Fernández-Llario P, García-Jiménez WL, Gonçalves P, Hurtado I, Cuesta J, Hermoso de Mendoza J. 2012. Influence of the kind of food and supply in wild ungulates tuberculosis prevalence in Mediterranean ecosystems. *International Wildlife Tuberculosis Conference (Skukuza, República Sudafricana)*.
- Coad M, Downs SH, Durr PA, Clifton-Hadley RS, Hewinson RG, Vordermeier HM, Whelan AO. 2009. Blood-based assays to detect *Mycobacterium bovis*-infected cattle missed by tuberculin skin testing. *Veterinary Record* 162: 382-384.
- Corner LA. 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.

- Cowie CE, Beltran Beck B, Gortazar C, Vicente J, Hutchings MR, Moran D, White PCL. 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 CE, Marreros N, Jaroso R, Gortázar C, White PCL, 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 CE, Gortázar C, White PCL, Hutchings MR, Vicente J. 2015. Stakeholder opinions on the practicality of management interventions to control bovine tuberculosis. *The Veterinary Journal* 204: 179-185.
- Cuezva Samaniego J. 1966. Erradicación de la Tuberculosis Bovina (ETB). Ed. Avigan. Valencia.
- de la Cruz ML, Perez A, Bezos J, Pages E, Casal C, Carpintero J, Romero B, Dominguez L, Barker CM, Diaz R, Alvarez J. 2014. Spatial dynamics of bovine tuberculosis in the Autonomous Community of Madrid, Spain (2010-2012). *PLoSOne* 9: e115632.
- de la Fuente J, Gortazar C, Vicente J, Villar M. 2011. Host expression of methylmalonyl-CoA mutase and tuberculosis: a missing link?. *Medical Hypotheses* 76: 361-364.
- Díez-Delgado I, Villar M, Romero B, Sevilla IA, Geijo MG, de la Fuente J, Aranaz A, Gortázar C, Juste RA, Garrido JM. 2014. Sensitization sequence is critical for protection in *M. bovis* infection in wild boar. Vth International *M. bovis* Conference. Cardiff, Great Britain.
- Di Marco V, Mazzone P, Capucchio MT, Boniotti MB, Aronica V, Russo M, Fiasconaro M, Cifani N, Corneli S, Biasibetti E, Biagetti M, Pacciarini ML, 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.
- Fernández-de-Mera IG, Vicente J, Höfle U, Ruiz Fons F, Ortiz JA, 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-Llario P, Carranza J, Cerrato R, García-Jiménez WL, Benítez JM, Risco D, Hermoso de Mendoza M, Hermoso de Mendoza J. 2010. The importance of feeding management in the control of tuberculosis in wild boar. 8th International Symposium on Wild Boar and Other Suids (York, Reino Unido).
- Ferrer Caubet L, Juste Jordán RA. 1983. Diagnóstico de la tuberculosis bovina mediante la prueba de la tuberculina. *Hygia Pecoris* 5 (8): 67-80.
- Fitzgerald LE, Abendaño N, Juste RA, Alonso-Hearn M. 2014. Three-dimensional in vitro models of granuloma to study bacteria-host interactions, drug-susceptibility, and resuscitation of dormant mycobacteria. *Biomed Research International* 2014: 623856. doi: 10.1155/2014/623856.
- Frigui W, Bottai D, Majlessi L, Monot M, Josselin E, Brodin P, Garnier T, Gicquel B, Martin C, Leclerc C, Cole ST, Brosch R. 2008. Control of *M. tuberculosis* ESAT-6 secretion and specific T cell recognition by PhoP. *PLoS Pathogens* 4:e33.
- Frothingham R, Meeker-O'Connell WA. 1998. Genetic diversity in the *Mycobacterium tuberculosis* complex based on variable numbers of tandem DNA repeats. *Microbiology* 144 (Pt 5): 1189-1196.

- Galagan JE. 2014. Genomic insights into tuberculosis. *Nature Reviews Genetics* 15: 307-320.
- García-Bocanegra I, Barranco I, Rodríguez-Gómez IM, Pérez B, Gómez-Laguna J, Rodríguez S, Ruiz-Villamayor E, Perea A. 2010. Tuberculosis in alpacas (*Lama pacos*) caused by *Mycobacterium bovis*. *Journal of Clinical Microbiology* 48:1960-1964.
- 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(4): e34908.
- García-Jiménez WL, Fernández-Llario P, Gómez L, Benítez-Medina JM, García-Sánchez A, Martínez R, Risco D, Gough J, Ortiz-Peláez A, Smith NH, Hermoso de Mendoza J, Salguero FJ. 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 WL, Benítez-Medina JM, Fernández-Llario P, Abecia JA, García-Sánchez A, Martínez R, Risco D, Ortiz-Peláez A, Salguero FJ, Smith NH, Gómez L, Hermoso de Mendoza J. 2013a. Comparative pathology of the natural infections by *Mycobacterium bovis* and by *Mycobacterium caprae* in wild boar (*Sus scrofa*). *Transboundary and Emerging Diseases* 60: 102-109.
- García-Jiménez WL, Fernández-Llario P, Benítez-Medina JM, Cerrato R, Cuesta J, García-Sánchez A, Gonçalves P, Martínez R, Risco D, Salguero FJ, Serrano E, Gómez L, Hermoso-de-Mendoza J. 2013b. Reducing Eurasian wild boar (*Sus scrofa*) population density as a measure for bovine tuberculosis control: Effects in wild boar and a sympatric fallow deer (*Dama dama*) population in Central Spain. *Preventive Veterinary Medicine* 110: 435-446.
- García-Jiménez WL, Salguero FJ, Fernández-Llario P, Martínez R, Risco D, Gough J, Ortiz-Peláez A, Hermoso-de-Mendoza J, Gómez L. 2013c. Immunopathology of granulomas produced by *Mycobacterium bovis* in naturally infected wild boar. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 156: 54-63.
- García-Saenz A, Saez M, Napp S, Casal J, Saez JL, Acevedo P, Guta S, Allepuz A. 2014. Spatio-temporal variability of bovine tuberculosis eradication in Spain (2006-2011). *Spatial and Spatio-temporal Epidemiology* 10: 1-10.
- Garrido JM, Sevilla IA, Beltran-Beck B, Minguíjon E, Ballesteros C, Galindo RC, Boadella M, Lyashchenko KP, Romero B, Geijo MV, Ruiz-Fons F, Aranaz A, Juste RA, 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. doi: 10.1371/journal.pone.0024905.
- Garrido JM, Vázquez O, Molina E, Plazaola JM, Sevilla IA, Geijo MV, Alonso-Hearn M, Juste RA. 2013. Paratuberculosis vaccination causes only limited cross-reactivity in the skin test for diagnosis of bovine tuberculosis. *PLoS ONE* 8(11): e80985. doi: 10.1371/journal.pone.0080985.
- Garrido JM, Minguíjón, Urkitza A, Geijo MV, Sevilla IA, Elgezabal N, Arrazuria R, Vázquez P, Vordermeier M, Whelan P, Juste RA. 2014. *M. bovis* infection detection after paratuberculosis vaccination in cattle. Vth International *M. bovis* Conference. Cardiff, Great Britain: 16-19.

- Gonzalo Asensio J, Maia C, Ferrer NL, Barilone N, Laval F, Soto CY, Winter N, Daffé M, Gicquel B, Martín C, Jackson M. 2006. The virulence-associated two-component PhoP-PhoR system controls the biosynthesis of polyketide-derived lipids in *Mycobacterium tuberculosis*. *The Journal of Chemistry* 281: 1313-1316.
- Gonzalo-Asensio J, Malaga W, Pawlik A, Astarie-Dequeker C, Passemar C, Moreau F, Laval F, Daffé M, Martin C, Brosch R, Guilhot C. 2014. Evolutionary history of tuberculosis shaped by conserved mutations in the PhoPR virulence regulator. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 111: 11491-11496.
- Gormley E, Corner LA. 2013. Control strategies for wildlife tuberculosis in Ireland. *Transboundary and Emerging Diseases* 60: 128-135.
- Gortázar C, Vicente J, Gavier-Widen D. 2003. Pathology of bovine tuberculosis in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Veterinary Record* 152: 779-780.
- Gortázar C, Vicente J, Samper S, Garrido J, Fernández-de-Mera IG, Gavín P, Juste RA, Martín C, Acevedo P, de la Fuente M, Höfle U. 2005. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates from wild ungulates in South-Central Spain. *Veterinary Research*: 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, Ferroglio E, Höfle U, Frölich K, Vicente J. 2007. Diseases shared between wildlife and livestock: a European perspective. *European Journal of Wildlife Research* 53: 241-256.
- Gortázar C, Torres MJ, Vicente J, Acevedo P, Reglero M, de la Fuente J, Negro JJ, 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(7): e2776 doi:10.1371/journal.pone.0002776.
- Gortázar C, Torres MJ, Acevedo P, Aznar J, Negro JJ, de la Fuente J, Vicente J. 2011a. Fine-tuning the space, time, and host distribution of mycobacteria in wildlife. *BMC Microbiology* 11: 27.
- Gortázar C, Vicente J, Boadella M, Ballesteros C, Galindo RC, Garrido JM, Aranaz A, de la Fuente J. 2011b. Progress in the control of bovine tuberculosis in Spanish wildlife. *Veterinary Microbiology* 151: 170-178.
- Gortázar C, Delahay R, McDonald R, Boadella M, Wilson G, Gavier-Widen D, Acevedo P. 2012. The status of tuberculosis in European wildlife. *Mammal Review* 42: 193-206.
- Gortázar C, Beltrán-Beck B, Garrido JM, Aranaz A, Sevilla I, Boadella M, Lyashchenko KP, Galindo RC, 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, Diez-Delgado I, Barasona JA, Vicente J, de la Fuente J, Boadella M. 2015. The wild side of disease control at the wildlife-livestock-human interface: A Review. *Frontiers in Veterinary Science*. En prensa.
- Grange JM, Yates MD, Boughton E. 1990. The avian tubercle bacillus and its relatives. *Journal of Applied Bacteriology* 68: 411-431.

- Guta S, Casal J, Garcia-Saenz A, Saez JL, Pacios A, Garcia P, Napp S, Allepuz A. 2014a. Risk factors for bovine tuberculosis persistence in beef herds of Southern and Central Spain. *Preventive Veterinary Medicine* 115: 3-4.
- Guta S, Casal J, Napp S, Saez JL, Garcia A, Perez B, Romero B, Alvarez J, Allepuz A. 2014b. Epidemiological investigation of the causes of bovine tuberculosis herd breakdowns in Spain. *Plos ONE* 9(8): e104383.
- Gutiérrez M, Samper S, Jiménez MS, van Embden JD, Marín JF, Martín C. 1997. Identification by spoligotyping of a caprine genotype in *Mycobacterium bovis* strains causing human tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology* 35: 3328-3330.
- Hermoso de Mendoza J, Parra A, Tato A, Alonso JM, Rey JM, 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.
- Hlokwe TM, Van Helden P, Michel AL. 2014. Evidence of increasing intra and inter-species transmission of *Mycobacterium bovis* in South Africa: are we losing the battle?. *Preventive and Veterinary Medicine* 115: 10-17.
- Inchausti I, Garrido J, Juste RA. 1997. Diagnóstico de la tuberculosis en llamas. II Seminario Internacional de Camélidos Sudamericanos Domésticos. Córdoba, Argentina.
- Jaroso R, Vicente J, Fernandez-de-Mera IG, Aranaz A, Gortazar C. 2010a. Eurasian wild boar response to skin-testing with mycobacterial and non-mycobacterial antigens. *Preventive Veterinary Medicine* 9: 211-217.
- Jaroso R, Vicente J, Martín-Hernando MP, Aranaz A, Lyashchenko K, Greenwald R, Esfandiari J, Gortazar C. 2010b. Ante-mortem testing wild fallow deer for bovine tuberculosis. *Veterinary Microbiology* 146: 285-289.
- Juste Jordán RA, Cuervo Menéndez L, Gelabert Pujol JL, Sáez de Ocáriz C, Marco Melero JC, Camón Urgel J. 1983. Paratuberculosis bovina en Vizcaya. *Hygia Pecoris* 5 (1): 57-67.
- Juste Jordán RA. 1989. Resultados de un estudio de campo sobre la prueba de intradermorreacción comparativa para el diagnóstico de la tuberculosis bovina. *Informes Técnicos* 26. Dpto. de Agricultura y Pesca. Gobierno Vasco.
- Juste RA, Minguijón E, Urkitza A, Geijo MV, Sevilla IA, Elgezabal N, Arrazuria R, Vázquez P, Garrido JM. 2014. Paratuberculosis vaccination confers partial protection against *M. bovis* infection in cattle. *Vth International M. bovis Conference*. Cardiff, Great Britain.
- Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten 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.
- Krajewska M, Zabost A, Welz M, Lipiec M, Orłowska B, Anusz K, Brewczyński P, Augustynowicz-Kopec E, Szulowski K, Bielecki W, Weiner M. 2015. Transmission of *Mycobacterium caprae* in a herd of European bison in the Bieszczady Mountains, Southern Poland. *European Journal of Wildlife Research* 61: 429-433.

- Kukielka E, Barasona JA, Cowie CE, Drewe JA, Gortazar C, Cotarelo I, Vicente J. 2013. Spatial and temporal interactions between livestock and wildlife in South Central Spain assessed by camera traps. *Preventive Veterinary Medicine* 112: 213-221.
- Martín-Hernando MP, Höfle U, Vicente J, Ruiz-Fons F, Vidal D, Barral M, Garrido JM, de la Fuente J, Gortazar C. 2007. Lesions associated with *Mycobacterium tuberculosis* Complex infection in the European wild boar. *Tuberculosis* 87: 360-367.
- Martín-Hernando MP, Torres MJ, Aznar J, Negro JJ, Gandía A, Gortázar C. 2010. Sampling strategy, lesion pattern and lesion distribution in naturally *Mycobacterium bovis* infected red deer and fallow deer. *Journal of Comparative Pathology* 142: 43-50.
- Medrano C, Boadella M, Barrios H, Cantú A, García C, de la Fuente J, Gortázar C. 2012. Zoonotic Pathogens among White-Tailed Deer, Northern Mexico, 2004–2009. *Emerging Infectious Diseases* 18: 1372-1374.
- Mentaberre G, Serrano E, Velarde R, Marco I, Lavin S, Mateos A, de Juan L, Domínguez L, Olivé X, Romeva J. 2010. Absence of TB in Iberian ibex (*Capra pyrenaica*) in a high-risk area. *Veterinary Record* 166: 700.
- Mentaberre G, Romero B, de Juan L, Navarro-González N, Velarde R, 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.
- Miller RS, Sweeney SJ. 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.
- Moiane I, Machado A, Santos N, Nhambir A, Inlamea O, Hattendorf J, Kallenius G, Zinsstag J, Correia-Neves M. 2014. Prevalence of bovine tuberculosis and risk factor assessment in cattle in rural livestock areas of Govuro District in the Southeast of Mozambique. *PLoS one* 9(3): e91527.
- Müller BL, Ramalho DM, Santos PF, Mesquita ED, Kritski AL, Oliveira MM. 2013. Inflammatory and immunogenetic markers in correlation with pulmonary tuberculosis. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 39: 719-727.
- Murphy D, Costello E, Aldwell FE, Lesellier S, Chambers MA, Fitzsimons T, Corner LA, 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.
- Muñoz-Mendoza M, de Juan L, Menéndez S, Ocampo A, Mourelo J, Sáez JL, Domínguez L, Gortázar C, García Marín JF, Balseiro A. 2012. Tuberculosis due to *Mycobacterium caprae* and *Mycobacterium bovis* in infection in sheep. *The Veterinary Journal* 191: 267-269.
- Muñoz-Mendoza M, Marreros N, Boadella M, Gortázar C, de Juan L, Bezos J, Romero B, Copano MF, Amado J, Menéndez S, Sáez JL, 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 M, del Cerro A, Gortázar C, García Marín JF, Menéndez S, Mourelo J, de Juan L, Sáez JL, Delahay RJ, Balseiro A. 2015. Sheep as a potential source of bovine TB: epidemiology, pathology and evaluation of diagnostic techniques. *Transboundary and Emerging Diseases*. doi: 10.1111/tbed.12325.
- Napp S, Allepuz A, Mercader I, Nofrarías 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. doi: 10.1136/vr.101347.
- Naranjo V, Ayoubi P, Vicente J, Ruiz-Fons F, Gortazar C, Kocan KM, de la Fuente J. 2006. Characterization of selected genes upregulated in non-tuberculous European wild boar as possible correlates of resistance to *Mycobacterium bovis* infection. *Veterinary Microbiology* 116: 224-231.
- Naranjo V, Acevedo-Whitehouse K, Gortazar C, Vicente J, de la Fuente J. 2008a. Influence of methylmalonyl-CoA mutase alleles on resistance to bovine tuberculosis in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Animal Genetics* 39: 316-320.
- Naranjo V, Gortázar C, Vicente J, de la Fuente J. 2008b. Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of tuberculosis due to *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Veterinary Microbiology* 127: 1-9.
- Parra A, Fernández-Llario P, Tato A, Larrasa J, García A, Alonso JM, Hermoso de Mendoza M, Hermoso de Mendoza J. 2003. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections of pigs and wild boars using a molecular approach. *Veterinary Microbiology* 97: 123-133.
- Parra A, Larrasa J, García A, Alonso JM, 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 NF, Tato A, Alonso JM, 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.
- Pérez de Val B, López-Soria S, Nofrarías M, Martín M, Vordermeier HM, Villarreal-Ramos B, Romera N, Escobar M, Solanes D, Cardona PJ, 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, Lopez-Soria S, Garrido JM, Vordermeier HM, Villarreal-Ramos B, Martín M, Puentes E, Juste RA, 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 FX, Xing Z, Vordermeier HM, Domingo M. 2012b. Goats primed with *Mycobacterium bovis* BCG and boosted with a recombinant adenovirus expressing Ag85A show enhanced protection against tuberculosis. *Clinical Vaccine Immunology* 19: 1339-1347.

- Pérez de Val B, Vidal E, Villarreal-Ramos B, Gilbert SC, Andaluz A, Moll X, Martín M, Nofrarías M, McShane H, Vordermeier HM, 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.
- Pfeifer D, Robinson T, Stevenson M, Stevens K, Rogers D, Clements A. 2008. Spatial risk assessment and management of disease. *Spatial Analysis in Epidemiology*. Nueva York, Oxford University Press 81-109.
- Prieto JM, Balseiro A, Casais R, Abendano N, Fitzgerald LE, Garrido JM, Juste RA, Alonso-Hearn M. 2014a. 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. doi: 10.1128/CVI.00159-14.
- Prieto JM, García-Marín JF, Casais R, González-Quirós P, Copano MF, Gortázar C, Balseiro A. 2014b. Evaluation of two enzyme-linked immunosorbent assays for detection of avian and bovine tuberculosis in Eurasian badger (*Meles meles*). In: *EWDA - 11th European Wildlife Disease Association Conference*. Edimburgo. Reino Unido.
- Queirós J, Vicente J, Boadella M, Gortázar C, Célio Alves P. 2014. The impact of management practices and past demographic history on the genetic diversity of red deer (*Cervus elaphus*): an assessment of population and individual fitness. *Biological Journal of the Linnean Society* 111: 209-223.
- RASVE. 2014. Programa Nacional de Erradicación de Tuberculosis Bovina presentado por España para el año 2014. <http://rasve.magrama.es/Publica/Programas/NORMATIVA%20Y%20PROGRAMAS%5CPROGRAMAS%5C2014%5CTUBERCULOSIS%20BOVINA%5CPROGRAMA%20TB%202014.PDF>
- Risco D, Fernández-Llario P, García-Jiménez WL, Gonçalves P, Cuesta JM, Martínez R, Sanz C, Sequeda M, Gómez L, Carranza J, de Mendoza JH. 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 JM, Gonçalves P, Garcia-Jiménez WL, Martinez R, Cerrato R, Velarde R, Gómez L, Segalés J, De Mendoza JH. 2014. Severity of bovine tuberculosis is associated with co-infection with common pathogens in wild boar. *PLoS ONE* 9.
- Rodríguez E, Sánchez LP, Pérez S, Herrera L, Jiménez MS, Samper S, Iglesias MJ. 2009. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* and *M. caprae* in Spain, 2004-2007. *The 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 JL, Mateos A, Domínguez L, Aranaz A. 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, Alvarez J, Castellanos E, Moya N, Lozano F, Tariq Javed M, Saez-Llorente JL, Liebana E, Mateos A, Dominguez L, Aranaz A. 2011. *Mycobacterium caprae* infection in livestock and wildlife, 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 IG, Castellanos E, Mateos A, Sáez-Llorente JL, Domínguez L, Aranaz A. 2012a. A database for animal tuberculosis (mycoDB.es) within the context of the Spanish national programme for eradication of bovine tuberculosis. *Infection, Genetics and Evolution* 12: 877-882.
- Rodríguez-Campos S, Schürch AC, Dale J, Lohan AJ, Cunha MV, Botelho A, De Cruz K, Boschi-rolí ML, Boniotti MB, Pacciarini M, García-Pelayo MC, Romero B, de Juan L, Domínguez L, Gordon SV, van Soolingen D, Loftus B, Berg S, Hewinson R G, Aranaz A, Smith NH. 2012b. European 2 - A clonal complex of *Mycobacterium bovis* dominant in the Iberian Peninsula. *Infection, Genetics and Evolution* 12(4): 866-872.
- Rodríguez-Campos S, Navarro Y, Romero B, de Juan L, Bezos J, Mateos A, Golby P, Smith NH, Hewinson GR, 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 JA, Acevedo P, Romero B, Rodríguez-Campos S, Gortázar C, Sánchez-Vizcaíno JM, Vicente J. 2013. A Bayesian approach to study the risk variables for tuberculosis occurrence in domestic and wild ungulates in South Central Spain. *BMC Veterinary Research* 8: 1-13.
- 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.
- Ruiz-Larrañaga O, Garrido JM, Iriondo M, Manzano C, Molina E, Koets AP, Rutten VPMG, Juste RA, Estonba A. 2010a. Genetic association between bovine NOD2 polymorphisms and infection by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Holstein-Friesian cattle. *Animal Genetics*. doi:10.1111/j.1365-2052.2010.02055.
- Ruiz-Larrañaga O, Garrido JM, Iriondo M, Manzano C, Molina E, Montes I, Vázquez P, Koets AP, Rutten VP, Juste RA, Estonba A. 2010b. SP110 as a novel susceptibility gene for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in cattle. *Journal of Dairy Science* 93(12): 5950-8. doi: 10.3168/jds.2010-3340.
- Ruiz-Larrañaga O, Garrido JM, Manzano C, Iriondo M, Molina E, Gil A, Koets AP, Rutten VPMG, Juste RA, Estonba A. 2010c. Identification of SNPs in the bovine *slc11a1* gene and their association with infection by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Journal of Dairy Science* 93: 1713-1721. doi: 10.3168/jds.2009-2438.
- Ruiz-Larrañaga O, Manzano C, Iriondo M, Garrido JM, Aguirre M, Vázquez P, Juste RA, Estonba A. 2011a. A Candidate SNP in the bovine SP110 gene is not associated with susceptibility to tuberculosis in cattle. *International Journal of Animal and Veterinary Advances* 3(6): 407-408.
- Ruiz-Larrañaga O, Manzano C, Iriondo M, Garrido JM, Molina E, Vázquez R, Juste RA, Estonba A. 2011b. Genetic variation of toll-like receptor genes and infection by *Mycobacterium avium* ssp *paratuberculosis* in Holstein-Friesian cattle. *Journal of Dairy Science* 94: 3635-3641. doi: 10.3168/jds.2010-3788.

- Rúiz-Larrañaga O, Iriondo M, Manzano C, Agirre M, Garrido JM, Juste JA, Estonba A. 2012. Single-nucleotide polymorphisms in the bovine CD209 candidate gene for susceptibility to infection by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Animal Genetics* 43(5): 646-7. doi: 10.1111/j.1365-2052.2011.02316.x.
- 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.
- Santos N, Correia-Neves M, Ghebremichael S, Källenius G, Svenson SB, Almeida V. 2009. Epidemiology of *Mycobacterium bovis* infection in wild boar (*Sus scrofa*) from Portugal. *Journal of Wildlife Diseases* 45: 1048-1061.
- Santos N, Geraldes M, Afonso A, Almeida V, Correia-Neves M. 2010. Diagnosis of tuberculosis in the wild boar (*Sus scrofa*): a comparison of methods applicable to hunter-harvested animals. *PLoS one* 5(9): e12663.
- Santos N, Gortázar C, Correia-Neves M, Almeida V. 2012. Wildlife tuberculosis: a systematic review of the epidemiology in Iberian Peninsula. INTECH Open Access Publisher.
- Sevilla IA, Molina E, Elguezabal N, Pérez V, Garrido JM, Juste RA. 2015. Detection of mycobacteria, *Mycobacterium avium* subspecies and *Mycobacterium tuberculosis* complex by a novel tetraplex real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 53: 930-940. doi: 10.1128/JCM.03168-14.
- Smith NH. 2012. The global distribution and phylogeography of *Mycobacterium bovis* clonal complexes. *Infection, Genetics and Evolution* 12: 857-65.
- Sobrinho R, Martín-Hernando MP, Vicente J, Aurtenetxe O, Garrido JM, Gortázar C. 2008. Bovine tuberculosis in a badger (*Meles meles*) from Spain. *Veterinary Record* 163: 159-160.
- Solans L, Aguiló N, Samper S, Pawlik A, Frigui W, Martín C, Brosch R, Gonzalo-Asensio J. 2014. A specific polymorphism in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv causes differential ESAT-6 expression and identifies WhiB6 as a novel ESX-1 component. *Infection and Immunity* 82: 3446-3456.
- Tato A. 1999. Infecciones por *Mycobacterium* spp. en animales salvajes en la provincia de Cáceres. Tesis doctoral. Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres.
- Vázquez P, Garrido JM, Juste RA. 2013a. Specific antibody and interferon-gamma responses associated with immunopathological forms of bovine paratuberculosis in slaughtered Friesian cattle. *PLOS One* 8(5): e64568. doi: 10.1371/journal.pone.0064568.
- Vázquez P, Garrido JM, Pérez V, Juste RA. 2013b. New insights into immunopathological forms of bovine paratuberculosis. *Journal of Comparative Pathology* 148: 52. doi: 10.1016/j.jcpa.2012.11.030.
- Vázquez P, Garrido JM, Molina E, Geijo MV, Gómez N, Pérez V, Sevilla IA, Alonso-Hearn M, Cortes A, Juste RA. 2014a. Latent infections are the most frequent form of paratuberculosis in slaughtered Friesian cattle. *Spanish Journal of Agricultural Research* 12(4): 1049-1060. doi: 10.5424/sjar/2014124-5978.

- Vázquez P, Rúa-Larrea O, Garrido JM, Iriondo M, Manzano C, Agirre M, Estonba A, Juste RA. 2014b. Genetic association analysis of paratuberculosis forms in Holstein-Friesian cattle. *Veterinary Medicine International* 2014: 321327. doi: 10.1155/2014/321327.
- Vicente J, Höfle U, Garrido JM, Fernández-De-Mera IG, Juste R, Barral M, Gortazar C. 2006. Wild boar and red deer display high prevalences of tuberculosis-like lesions in Spain. *Veterinary Research* 37 (1): 107-119.
- Vicente J, Höfle U, Garrido JM, Fernández-De-Mera IG, Acevedo P, Juste R, Barral M, Gortazar C. 2007a. Risk factors associated with prevalence of tuberculosis-like lesions in wild boar and red deer in South Central Spain. *Veterinary Research* 38: 451-464.
- Vicente J, Höfle U, Fernández-de-Mera IG, Gortázar C. 2007b. The importance of parasite life-history and host density in predicting the impact of infections in red deer (TB and *E. cervi*). *Oecologia* 152 (4): 655-664.
- Vicente J, Barasona JA, Acevedo P, Ruiz-Fons JF, Boadella M, Diez-Delgado I, Beltran-Beck B, González-Barrio D, Queirós J, Montoro V, de la Fuente J, Gortazar C. 2013. Temporal trend of tuberculosis in wild ungulates from Mediterranean Spain. *Transboundary and Emerging Diseases* 60: 92-103.
- Vordermeier HM, Pérez de Val B, Buddle BM, Villarreal-Ramos B, Jones GJ, Hewinson RG, Domingo M. 2014. Vaccination of domestic animals against tuberculosis: Review of progress and contributions to the field of the TBSTEP project. *Research in Veterinary Science* 97, Supple, S53-S60.
- Wobeser G. 2009. Bovine tuberculosis in Canadian wildlife: an updated history. *Canadian Veterinary Journal* 50: 1169-1176.
- Zumárraga MJ, Bernardelli A, Bastida R, Quse V, Loureiro J, Cataldi A, Bigi F, Alito A, Castro Ramos M, Samper S, Otal I, Martin C, Romano MI. 1999. Molecular characterization of mycobacteria isolated from seals. *Microbiology* 145 (Pt 9): 2519-2526.

## ANEXO I: OBJETIVOS INMEDIATOS Y BENEFICIOS DE LA INVESTIGACIÓN ESPAÑOLA EN TUBERCULOSIS ANIMAL

Tema	Grupo	Campo	Objetivo	Beneficio
Bioseguridad	SaBio IREC	Control	Aplicar, en colaboración con los ganaderos, programas de mejora de la bioseguridad a explotaciones ganaderas extensivas	Reducción del riesgo de TB y otras enfermedades compartidas
Bioseguridad	SERIDA	Control	Establecimiento de una guía de medidas de bioseguridad en explotaciones ganaderas	Propuestas de actuación práctica en bioseguridad ganadera (norte peninsular)
Coinfecciones	UEX	Control	Valoración del efecto de vacunas contra agentes inmunosupresores y de tratamientos antiparasitarios estratégicos	Potencial aplicación para combatir inmunosupresión y mejorar la inmunidad de las poblaciones animales frente a la TB, y la reactividad de los bovinos a los procedimientos diagnósticos oficiales
Control fauna	SaBio IREC	Control	Conocer bien el papel de cada especie hospedadora en el mantenimiento de la TB, y los efectos de su control sobre el conjunto del sistema	Posibilidad de incorporar opciones de control poblacional o afines a los programas integrados de control de la TB
Control fauna	SeFaS UAB	Control	Diseño de estrategias para reducir la abundancia de jabalí en zonas abiertas	Reducción del riesgo sanitario asociado a la sobreadundancia de jabalí
Genética	SERIDA	Control	Confirmar la existencia de genotipos bovinos resistentes/susceptibles a la infección por TB	Reducción de animales genéticamente susceptibles en las explotaciones
Genética de CMT	UNIZAR	Control	Conocer los mecanismos que diferencian la mayor transmisión de los distintos miembros del complejo en los distintos hospedadores	Posibilidad de actuar con medidas mejor dirigidas
Genética de CMT	UNIZAR	Control	Caracterización de la vacuna viva MTBVAC que actualmente se encuentra en fase clínica en humanos	Permitirá comprender el efecto deletéreo de la mutación G71I sobre la proteína PhoR de <i>M. bovis</i>
Monitorización	UCO	Control	Evaluar la evolución de la TB en artiodáctilos silvestres tras la implantación de la Orden de 2/5/2012 sobre residuos de caza, y su efecto sobre el ganado doméstico en Andalucía	Mejora programa control

Tema	Grupo	Campo	Objetivo	Beneficio
Vacunación	IRTA-CReSA	Control	Estudios de campo con la vacuna BCG en granjas de caprina con elevada prevalencia de TB	Establecimiento de pautas de vacunación en la especie caprina para su potencial aplicación en campañas de control y/o erradicación
Vacunación	IRTA-CReSA	Control	Estudio de la seguridad, tolerabilidad, inmunogenicidad y eficacia de nuevos candidatos vacunales (por ej. vacunas inactivadas) e inmunomoduladores en caprinos	Desarrollo de nuevos tratamientos seguros y eficaces para el control de la TB caprina
Vacunación	IRTA-CReSA	Control	Desarrollo de un modelo de infección experimental y evaluación de vacunas en la especie ovina	Potencial desarrollo de herramientas de control de la TB en ovino
Vacunación	NEIKER	Control	Desarrollo de métodos de protección inmune	Prevención de la difusión de las micobacteriosis y reducción de sus costos económicos y sociales
Vacunación	SaBio IREC	Control	Avanzar hacia el desarrollo de vacunas o inmunoestimulantes que contribuyan al control de la TB sin interferir en diagnóstico	Disponer de vacunas o inmunoestimulantes como herramienta complementaria, dentro de un control integrado de la TB animal
Vacunación	SaBio IREC/ NEIKER/ VISAVET	Control	Diseñar cebos adecuados para la administración eficaz, segura y efectiva de vacunas u otros compuestos a ciervos	Capacidad para administrar de forma selectiva productos por vía oral a ciervos, en condiciones de campo
Vacunación	SaBio IREC/ NEIKER/ VISAVET	Control	Conocer la respuesta de los rumiantes a la administración oral de <i>M. bovis</i> inactivado por calor	Potencialmente, desarrollo de estrategias de vacunación o inmunoestimulación en rumiantes
Bioseguridad	SaBio IREC	Control	Conocer en profundidad los mecanismos de mantenimiento de la infección en sistemas multi-hospedador	Posibilidad de desarrollar programas de bioseguridad que permitan mejorar la situación sanitaria en explotaciones ganaderas y cinegética-posibilidad de actuar sobre determinados factores de riesgo (alimentación suplementaria, traslados...)

Tema	Grupo	Campo	Objetivo	Beneficio
Diagnóstico	SaBio IREC/ NEIKER/ VISAVET	Control	Evaluar el efecto de la administración oral de <i>M. bovis</i> inactivado por calor en los resultados de los test diagnósticos in-vivo, en rumiantes	Desarrollar pautas de vacunación o inmunoestimulación que no interfieran con el diagnóstico de TB basado en la respuesta celular
Vacunación	SERIDA	Control	Modelo de infección y evaluación de la seguridad y la eficacia de vacunas antituberculosas en corderos desafiados con <i>Mycobacterium bovis</i>	Potencial desarrollo de pautas vacunales para ovino
Vacunación	SERIDA	Control	Evaluación de la seguridad y la eficacia de vacunas antituberculosas en tejones desafiados con <i>Mycobacterium bovis</i>	Potencial desarrollo de pautas vacunales para tejón
Vacunación	UEX	Control	Evaluación de la seguridad y la eficacia de vacunas antituberculosas inactivadas orales en el campo, para rumiantes domésticos y salvajes	Potencial desarrollo de pautas vacunales para aplicación en el campo
Pruebas celulares	UM	Diagnóstico	Conocer la influencia de tuberculinizaciones sucesivas, paratuberculosis, pseudo-tuberculosis, parasitaciones y vacunas frente a paratuberculosis en el diagnóstico de TB caprina	Mejora del diagnóstico en las campañas de saneamiento caprino
Detección CMT en ambiente y vías excreción	Junta C y L/VISAVET	Diagnóstico	Validación de la técnica de extracción directa de ADN a partir de tejido o muestras ambientales como alternativa al cultivo bacteriológico	Acelerar la confirmación de la TB y el proceso de erradicación
Diagnóstico	Junta C y L/VISAVET	Diagnóstico	Desarrollo de nuevos antígenos para la mejora de las pruebas diagnósticas actuales de base celular, el desarrollo de nuevas plataformas de diagnóstico de TB base humoral y la diferenciación de animales vacunados de infectados	Mejora de las técnicas diagnósticas de TB
Diagnóstico	SaBio IREC	Diagnóstico	Mejorar el diagnóstico <i>in vivo</i> de TB en explotaciones comerciales de ciervo y jabalí	Ayudar al sector cinegético y contribuir a la mejora de la situación sanitaria de la caza
Diagnóstico	SeFaS UAB	Diagnóstico	Evaluar la interacción de la linfadenitis caseosa en el diagnóstico de TB	Mejora la interpretación del diagnóstico de TB por ELISA

Tema	Grupo	Campo	Objetivo	Beneficio
Diagnóstico	UM	Diagnóstico	Estudiar las causas que provocan la ausencia de respuesta de caprinos infectados a los distintos métodos de diagnóstico, y la respuesta de animales sin TB	Mejora de los métodos de diagnóstico
Pruebas celulares	Junta C y L/VISAVET	Diagnóstico	Evaluación de la sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas oficiales de TB de base celular en ganado bovino y caprino en diferentes condiciones epidemiológicas	Mejorar los programas de erradicación de TB en ganado bovino y caprino
Pruebas celulares	Junta C y L/VISAVET	Diagnóstico	Determinación de la potencia de las tuberculinas en cobayas y ganado bovino y caprino	Mejora de las técnicas diagnósticas de TB
Serología	INGENASA	Diagnóstico	Desarrollo de un ELISA de captura para la detección de IgG e IgM específica de TB en ganado porcino	Detección de animales infectados y determinación en el tiempo de cuando se ha producido esa infección
Serología	INGENASA	Diagnóstico	Desarrollo de ensayos inmunocromatográficos para la detección de TB en distintas especies	Detección de animales infectados sin necesidad de un equipo complejo ni personal especialmente cualificado. Especialmente útil para fauna silvestre. Posibilidad de realizar el ensayo en el campo
Serología	IRTA-CReSA	Diagnóstico	Mejora de las herramientas de diagnóstico de TB en hospedadores domésticos y silvestres	Potencial mejora de las campañas de erradicación, vigilancia y vacunación en animales domésticos y silvestres
Serología	Junta C y L/VISAVET	Diagnóstico	Evaluación de la sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas de TB de base humoral y efecto de su aplicación conjuntamente con las pruebas de base celular	Evaluación de la serología para su inclusión como técnica complementaria en los programas de erradicación de TB
Análisis de riesgos	IRTA-CReSA	Epidemiología	Estudio de los factores asociados con la recurrencia y la persistencia de la TB	Identificar en qué zonas hay mayor riesgo de recurrencia y/o persistencia, e identificar los factores asociados con esta recurrencia y/o persistencia

Tema	Grupo	Campo	Objetivo	Beneficio
Análisis de riesgos	IRTA-CReSA	Epidemiología	Estudio de la influencia de aspectos sociológicos en el programa de control	Conocimiento sobre la percepción y actitud que tienen los ganaderos y los veterinarios sobre el control de la TB bovina y su posible influencia en el programa de erradicación
Análisis de riesgos	Junta C y L/VISAVET	Epidemiología	Evaluar el impacto que distintos factores relacionados tanto con el hospedador como con el patógeno tienen para la evolución de la enfermedad y su efecto en las campañas de erradicación de la TB bovina	Mejora en los programas de erradicación al detectar los factores epidemiológicos más importantes que ayuden a demostrar la direccionalidad de la transmisión entre explotaciones
Análisis de riesgos	NEIKER	Epidemiología	Identificación de factores epidemiológicos en la persistencia de la TB bovina en el medio rural	Prevención de la difusión de las micobacteriosis y reducción de sus costos económicos y sociales
Aspectos económicos	IRTA-CReSA	Epidemiología	Eficacia y rentabilidad de diferentes estrategias para la eliminación de la TB de las granjas infectadas	Conocimiento sobre cuáles serían las estrategias más eficaces y rentables para la eliminación de la TB de las granjas infectadas
Coinfecciones	UEX	Epidemiología	Estudio epidemiológico de agentes inmunosupresores en explotaciones bovinas	Identificación de posibles agentes agravantes de TB y potenciales causantes de inmunosupresión que ocasionen falsos negativos en pruebas de saneamiento
Detección CMT en ambiente y vías excreción	HHUU Virgen del Rocío	Epidemiología	Mejor capacidad de detección de DNA del CMT en diversos sustratos como barro, purines, etc.	Mejorar el entendimiento de la transmisión indirecta de CMT
Detección CMT en ambiente y vías excreción	UEX	Epidemiología	Desarrollo de técnicas de PCR cuantitativa sobre muestras biológicas, terreno y agua	Identificación de riesgos de transmisión directos desde animales infectados y desde el ambiente, y evaluación del efecto de medidas de control en los animales
Detección CMT en ambiente y vías excreción	UMinho-CiBio	Epidemiología	Identificar super-excretores en poblaciones de jabalí y ciervo	Posibles nuevas herramientas de manejo a través del control selectivo de super-excretores

Tema	Grupo	Campo	Objetivo	Beneficio
Detección CMT en ambiente y vías excreción	UMinho-CiBio	Epidemiología	Identificar lugares de riesgo, así como épocas del año de más riesgo con el fin de evitar la transmisión indirecta de TB a partir de la contaminación ambiental con micobacterias patógenas	Posibles nuevas herramientas de manejo que disminuyan la transmisión indirecta de la infección
Epi molecular	HHUU Virgen del Rocío	Epidemiología	Aplicaciones en sistemas multi-hospedador (Doñana) y en medicina	Mejorar el conocimiento de los sistemas multi-hospedador
Epi molecular	Junta C y L/VISAVET	Epidemiología	Estudio de la distribución y frecuencia de los espoligotipos y/o VNTRtipos en las explotaciones bovinas y silvestres en España, por CCAA, provincias y municipios	Mejora en los programas de erradicación que ayuden a demostrar la direccionalidad de la transmisión entre explotaciones
Epi molecular	UNIZAR	Epidemiología	Vigilar los aislados que se mantienen en nuestra población (humana)	Mejora de los programas de control
Genética	SaBio IREC	Epidemiología	Ampliar el conocimiento de la relación entre genotipo de hospedadores silvestres y susceptibilidad a TB	Posible identificación de medidas de gestión que promuevan mayor variabilidad genética o eviten situaciones de riesgo
Interacción	SeFaS UAB	Epidemiología	Estudio de las interacciones entre ganado doméstico y fauna salvaje	Identificación de riesgos y mejora de la prevención
Interacción	IRTA-CReSA	Epidemiología	Conocer la situación del caprino, ovino y del porcino extensivo en relación a la infección por bacterias del complejo <i>Mycobacterium</i>	Papel epidemiológico de los potenciales reservorios domésticos en España
Interacción	SaBio IREC	Epidemiología	Conocer en profundidad los mecanismos de mantenimiento de la infección en sistemas multi-hospedador	Mejora de los programas de control a distintas escalas, incorporando los nuevos conocimientos
Interacción	SERIDA	Epidemiología	Estudio de la interacción entre fauna y especies domésticas en explotaciones bovinas positivas a TB del norte peninsular	Identificación de riesgos en bioseguridad ganadera
Interacción	UCO	Epidemiología	Establecer el papel epidemiológico del ganado caprino en la epidemiología de la TB en España	Mejora programa control

Tema	Grupo	Campo	Objetivo	Beneficio
Interacción	UCO	Epidemiología	Establecer el papel epidemiológico que juega el ovino en la epidemiología de la TB en España	Mejora programa control
Interacción	UCO	Epidemiología	Establecer el papel epidemiológico que juega el porcino en la epidemiología de la TB en España	Mejora programa control
Monitorización	IRTA-CReSA	Epidemiología	Desarrollo de un sistema de vigilancia basada en riesgo a nivel de granja	Establecer, para distintas tipologías de granjas (en función de su riesgo), el nivel de vigilancia adecuado que nos permita maximizar los recursos disponibles
Monitorización	SaBio IREC	Epidemiología	Desarrollar nuevas herramientas para la monitorización poblacional y sanitaria de fauna silvestre	Facilitar la vigilancia sanitaria en fauna silvestre, y la evaluación de la eficacia de eventuales intervenciones
Monitorización	SeFaS UAB	Epidemiología	Estudio de la TB en la fauna silvestre de Cataluña	Identificación de riesgos y mejora de la prevención
Nutrición y TB	UEX	Epidemiología	Identificación de factores nutricionales responsables de inmunosupresión en las poblaciones animales	Posible desarrollo de pautas nutricionales, fórmulas de pienso y correctores que potencien la respuesta inmunitaria
Transferencia en general	SaBio IREC	Transferencia	Llevar a mercado los resultados desarrollados hasta la fecha	Ayudar a los sectores ganadero extensivo y cinegético, entre otros. Mejorar la percepción sobre utilidad/aplicabilidad de la ciencia en los sectores beneficiados
Transferencia en general	SaBio IREC	Transferencia	Implicar al sector ganadero extensivo en la lucha contra la TB, mediante la transferencia de resultados de investigación	Reducir la incidencia de TB en ganadería extensiva, principalmente bovina y porcina
Transferencia en general	UNIZAR	Transferencia	Llevar a mercado los resultados desarrollados hasta la fecha	Aplicación de la vacuna para el control de la TB y conseguir su erradicación
Transferencia diagnósticos	INGENASA	Transferencia	Llevar a mercado los resultados desarrollados hasta la fecha	Ayudar a los sectores ganadero intensivo, extensivo y cinegético, entre otros

## ANEXO II: LISTA DE INVESTIGADORES

Centro	Nombre y apellidos	E-mail
SERIDA	Ana Balseiro Morales	abalseiro@serida.org
	José Miguel Prieto	jmprieto@serida.org
	Luis José Royo	ljroyo@serida.org
	Alberto Espí	aespi@serida.org
	Ana del Cerro	anadc@serida.org
	Rosa Casais	rosacg@serida.org
	Isabel Márquez	imarquez@serida.org
Xunta de Galicia	Marta Muñoz Mendoza	marta.munoz.mendoza@xunta.es
MAGRAMA	José Luis Sáez	jsaezll@magrama.es
ULE	Juan Francisco García Marín	jfgarm@unileon.es
IRTA-CReSa	Bernat Pérez de Val	bernat.perez@irta.cat
	Enric Vidal Barba	enric.vidal@irta.cat
	Sergio López Soria	sergio.lopez@irta.cat
	Miquel Nofrarias Espdamala	miquel.nofrarias@irta.cat
	Mariano Domingo Álvarez	mariano.domingo@uab.cat
	Maite Martín Fernández	maite.martin@irta.cat
	Zoraida Cervera Muñoz	zoraida.cervera@irta.cat
VISA VET	Lucas Domínguez Rodríguez	lucasdo@visavet.ucm.es
	Beatriz Romero Martínez	bromerom@visavet.ucm.es
	Lucía de Juan Ferré	dejuan@visavet.ucm.es
	Javier Bezos Garrido	jbezosga@visavet.ucm.es
	Emmanouil Liandris	emmliand@ucm.es
	Carmen Casal Comendador	carmen_casal@visavet.ucm.es
	Natalia Sánchez Coppel	natsano3@ucm.es
	Álvaro Roy Cordero	alvaro.roy@ucm.es
	Francisco Javier Lozano Barrilero	franlozano@visavet.ucm.es
	Nuria Moya Álvarez	nmoyaalv@visavet.ucm.es
	Tatiana Alende García	tatiana@visavet.ucm.es
	Alexandra Gutiérrez Tobaruela	alexandra_gutierrez@visavet.ucm.es
	Cristina Viñolo Águeda	cristina.vinolo@visavet.ucm.es
	Johanna Alejandra Gimeno Pisano	johanna@visavet.ucm.es
	Daniela de la Cruz Curazzi	d.delacruz@visavet.es

Centro	Nombre y apellidos	E-mail
UCO	Ignacio García Bocanegra	nacho.garcia@uco.es
	Jorge Paniagua Risueño	jorgepaniaguariusueno@gmail.com
	David Cano Terriza	davidcanovet@gmail.com
	Antonio José Arenas Montes	anto.a.m@hotmail.com
	Antonio Arenas Casas	arenas@uco.es
UM	José Antonio Navarro Cámara	jnavarro@um.es
	Joaquín Sánchez Campillo	jsanchez@um.es
	Antonio Buendía Marín	abuendia@um.es
	Jesús Salinas Lorente	jsalinas@um.es
	Nieves Ortega Hernández	nortega@um.es
	Pilar Torreblanca Aranda	pilar.torreblanca@carm.es
	Paulina Cámara García	paulina.camara@carm.es
IRTA-CReSa/UAB	Sebastian Napp	Sebastian.napp@cresa.uab.cat
	Jordi Casal	jordi.casal@uab.cat
	Ariadna García	Ariadna.garcia@cresa.uab.cat
	Giovanna Ciaravino	Giovanna.Ciaravino@uab.cat
	Alberto Allepuz	alberto.allepuz@uab.cat
Junta de Castilla y León	Olga Mínguez González	mingonol@jcy.es
	Anna Grau Vila	gravilan@jcy.es
	Olegario Martín Gómez	margomol@jcy.es
	Jesús A. Nácar Cuesta	EXT-naccueje@jcy.es
UNIZAR	Piedad Arazo Garcés	parazo@salud.aragon.es
	María José Revillo	mjrevillo@salud.aragon.es
	Sofía Samper Blasco	ssamper.iacs@aragon.es / samper@unizar.es
	María Luisa Monforte	mlmonforte@salud.aragon.es
	Carlos Martín Montañés	carlos@unizar.es
	Juan Ignacio Aguiló Anento	naguilo@unizar.es
	José Antonio Ainsa Claver	ainsa@unizar.es
	Samuel Álvarez Arguedas	salvarez@unizar.es
	Rebeca Bailo Vergara	rebecab@unizar.es
	Esther Broset Blasco	ebroset@unizar.es
	Alberto Cebollada Solanas	alberto@unizar.es
	Ana Belén Gómez Aguirre	abgomez@unizar.es
	Begoña Gracia Díaz	bgracia@unizar.es
Carmen Lafoz Pueyo	clafoz@unizar.es	

Centro	Nombre y apellidos	E-mail
UNIZAR	Carlos Lampreave Carrillo	clampre@unizar.es
	Dessislava Marinova	tbvacman@unizar.es
	Isabel Otal Gil	otali@unizar.es
	Ana Picó Marco	apico@unizar.es
	Santiago Uranga Maíz	suranga@unizar.es
	Jesús Gonzalo Asensio	jagonzal@unizar.es
	Liliana Rodrigues	liliana.Rodrigues@unizar.es
	Clara Aguilar Pérez	clara.a@unizar.es
	Asunción Vitoria	avitoria@salud.aragon.es
	María José Iglesias	iglesias@unizar.es
	Ainhoa Lucía Quintana	ainhoalq@unizar.es
SEFaS	Santiago Lavín	santiago.lavin@uab.cat
	Ignasi Marco	ignasi.marco@uab.cat
	Jorge Ramón López Olvera	jordi.lopez.olvera@uab.cat
	Roser Velarde	roser.velarde@uab.cat
	Emmanuel Serrano	emmanuel.serrano@uab.cat
	Gregorio Mentaberre	gregorio.mentaberres@uab.cat
SaBio-IREC	Azlan Bin Che Amat	Azlan.BinChe@uclm.es
	Beatriz Beltrán Beck	Beatriz.Beltran@uclm.es
	Carlos Vladimir López	vladimirlopez6@gmail.com
	Christian Gortázar	Christian.Gortazar@uclm.es
	Azlan Bin Che Amat	Azlan.BinChe@uclm.es
	David González Barrio	David.Gonzalez@uclm.es
	Iratxe Díez Delgado	iratxe.diezdeldgado@gmail.com
	Isabel G. Fernández de Mera	Marialsabel.Garcia@uclm.es
	Joao Luis Teixeira Queiros	jlqueiros.vet@gmail.com
	Joao Pedro Valente Santos	joaovalente@ua.pt
	Joaquín Vicente Baños	Joaquin.Vicente@uclm.es
	José Ángel Barasona García-Arevalo	JoseAngel.Barasona@uclm.es
	José de la Fuente	jose_delafuente@yahoo.com
	José Francisco Ruiz Fons	JoseFrancisco.Ruiz@uclm.es
	Margarita Villar Rayo	MargaritaM.Villar@uclm.es
	María Ángeles Riscalde Moya	MariaA.Riscalde@uclm.es
	Pelayo Acevedo Lavandera	pelayo.acevedo@gmail.com
	Vidal Montoro Angulo	Vidal.Montoro@uclm.es
	SABIOtec	Mariana Boadella

Centro	Nombre y apellidos	E-mail
NEIKER	Ramón A. Juste	rjuste@neiker.eus
	Joseba M. Garrido	kgarrido@neiker.eus
	Iker Agirregomoscorta	isevilla@neiker.eus
	Natalia Elgezabal	nelgezabal@neiker.eus
	Marta Alonso-Hearn	malonso@neiker.eus
	Marta Barral	mbarral@neiker.eus
	Mariví Geijo	mgeijo@neiker.eus
	Elena Molina	emolina@neiker.eus
	Rakel Arrazuria	rfernandez@neiker.eus
Miriam Serrano	mserrano@neiker.eus	
ICVS-CIBIO	Nuno Santos	pygargusv@sapo.pt
	Margarida Correia-Neves	mcorreianeves@ecsau.de.uminho.pt
PATIN-UEX	Javier Hermoso de Mendoza Salcedo	jhermoso@unex.es
	Miguel Hermoso de Mendoza Salcedo	mhermoso@unex.es
	Joaquín Rey Pérez	reyjoaquin@gmail.com
	Juan Manuel Alonso Rodríguez	jmalonso@unex.es
	Luis Gómez Gordo	luisgomezgordo@gmail.com
	Waldo L. García Jiménez	walgarjim@unex.es
	David Risco Pérez	driscope@unex.es
	Remigio Martínez Pérez	remimar@unex.es
	Pilar Gonçalves Blanco	pgoncalvesblanco@gmail.com
	María Cortés Gómez	cortes581@hotmail.com
	Pedro Fernández Llario	pedro@ingulados.com
	Rosario Cerrato Horrillo	rosario@ingulados.com
	Alfredo García Sánchez	fredgarsa@gmail.com
Cristina Sanz	cristina.sanz@gobex.es	
Manuel Sequeda Tena	manuel.sequeda@gobex.es	
INGENASA	Paloma Rueda Pérez	prueda@ingenasa.com
	Ángel Venteo Moreno	aventeo@ingenasa.com





Gijón, 17 y 18  
de septiembre de 2015

# I WORKSHOP NACIONAL DE INVESTIGACIÓN EN TUBERCULOSIS ANIMAL

Organiza



**SERIDA**

Servicio Regional de Investigación  
y Desarrollo Agroalimentario

Financian



Instituto Nacional de Investigación  
y Tecnología Agraria y Alimentaria



Unión Europea Fondo Europeo de Desarrollo Regional

**Gijón** | **Convention Bureau**

Colaboran



GOBIERNO DEL  
PRINCIPADO DE ASTURIAS  
[www.asturias.es](http://www.asturias.es)



GOBIERNO DEL  
PRINCIPADO DE ASTURIAS  
CONSEJERÍA DE DESARROLLO RURAL  
Y ECONOMÍA LOCAL



**CARRIZAL II**



**Zerep**  
Zona de Empleo Rural